

权 利 要 求 书

1. 一种检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片，由玻片、硅片、膜或高分子材料和固定在其表面的 DNA 探针所构成，其特征在于：所说的 DNA 探针为检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的特异 DNA 探针。
2. 如权利要求 1 所说的基因芯片，其特征在于，所说的引起结核杆菌抗药性相关基因突变的特异 DNA 探针为引起异烟肼抗药性的 *katG* 基因、*inhA* 基因、*oxyR* 基因和 *ahp C* 基因的中间区域；引起利福平抗药性的 *rpoB* 基因；引起链霉素抗药性的 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因；引起乙胺丁醇抗药性的 *embB* 基因；引起吡嗪酰胺抗药性的 *pncA* 基因和引起 Fluoroquinolones 抗药性的 *gyrA* 基因，所说的引起利福平抗药性的 *rpoB* 基因突变探针为：

W1	gga gtt ctt cgg cac	
W2	cag cca gct gag cca	
W3	agc tga gcc aat tca	
W4	att cat gga cca gaa	
W5	tgg acc aga aca acc	
W6	caa ccc gct gtc ggg	
W7	ccg ctg tcg ggg tt	
W8	ggt tga ccc aca agc	
W9	ttg acc cac aag cgc	
W10	aag cgc cga ctg tcg	
W11	cga ctg tcg gcg ctg	
W12	tcg gcg ctg ggg ccc	
M1	gga gtt gtt cgg cac	
M2	cca gcc atc tga gcc	
M3	agc cag cng agc caa	n---c, g
M4	cca gct ggg cca att	
M5	cag ctg acc caa ttc	
M6	gct gag cna att cat	n---a, g
M7	ctg agc cna ttc atg	n---t, c
M8	agc caa ttc ttc atg	
M9	gcc aat tca tgt tca	
M10	cat gga caa ccc gct	
M11	gga cca gaa ccc gct	
M12	att cat gaa caa ccc	
M13	tgg acc acc cgc tgt	
M14	gct gag cat gga cca	

M15	ctg agc cac cag aac	
M16	aat tca tag acc aga	
M17	att cat gta cca gaa	
M18	ttc atg gtc cag aac	n---t,g
M19	tca tgg agc aga aca	
M20	caa ccc gat gtc ggg	
M21	ccc gct gcc ggg gtt	
M22	ccg ctg tng ggg ttg	n---t,a
M23	ggg ttg aac cac aag	
M24	gtt gac can caa gcg	n---t,g,a
M25	ttg acc cnc aag cgc	n---g,t,c
M26	tga ccc ana agc gcc	n---a,g
M27	aag cgc caa ctg tgc	
M28	ccg act gcc ggc gct	
M29	cga ctg tng gcg ctg	n---a,t,g
M30	gac tgt ctg cgc tgg	
M31	tgc gcg ccg ggg ccc	

所说的引起链霉素抗药性的 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因突变探针为:

S12-9(1):	ctg gtc cgc aag ggt	
S12-9(2):	ctg gtc cac aag ggt	
S12-43(1):	act ccg aag aag ccg	
S12-43(2):	act ccg agg aag ccg	
S12-88(1):	cgg gtg aag gac ctg	
S12-88(2):	cgg gtg agg gac ctg	
S12-88(3):	cgg gtg cag gac ctg	
S12-93(1):	gcc tgg tgt gcg cta	
S12-93(2):	gcc tgg tat gcg cta	
16S-491(1):	gaa gaa gca ccg gcc	
16S-491(2):	gaa gaa gta ccg gcc	
16S-512(1):	gtg cca gca gcc gcg	
16S-512(2):	gtg cca gta gcc gcg	
16S-513(2):	gtg cca gct gcc gcg	
16S-516(1):	cag cag ccg cgg taa	
16S-516(2):	cag cag ctg cgg taa	
16S-798(1):	tag tcc acg ccg taa	
16S-798(2):	tag tcc atg ccg taa	
16S-877(1):	ccg cct ggg gag tac	
16S-877(2):	ccg cct gag gag tac	
16S-904(1):	taa aac tca aag gaa	
16S-904(2):	taa aac tna aag gaa	n---a,g
16S-905(1):	aaa act caa agg aat t	

16S-905(2): ' aaa act cga agg aat t
 16S-906(2): aaa act cac agg aat t

引起 Fluoroquinolones 抗药性的 *gyrA* 基因突变探针:

GyrA88(1): ccc gca cgg cga cgc
 GyrA88(2): ccc gca ctg cga cgc
 GyrA90(1): ggc gac gcg tcg atc
 GyrA90(2): ggc gac gtg tcg atc
 GyrA91(1): cga cgc gtc gat cta
 GyrA91(2): cga cgc gcc gat cta
 GyrA94(1): gat cta cga cag cct
 GyrA94(2): gat cta cna cag cct n---a,t,c
 GyrA94(3): gat cta cgn cag cct n---c,g

所说的引起异烟肼抗药性的 *katG* 基因、*inhA* 基因、*ahpC* 基因、*oxyR* 基

因和 *ahp C* 基因的中间区域突变探针为:

OA4(1): ttt ggt tgc gac att
 OA4(2): ttt ggt tac gac att
 OA-4(1): gcg aca ttc cat cgt
 OA-4(2): gcg aca tcc cat cgt
 OA-6(1): gac att cca tcg tgc
 OA-6(2): gac att cta tcg tgc
 OA-9(1): att cca tcg tgc cgt
 OA-9(2): att cca ttg tgc cgt
 OA-10(2): att cca tcn tgc cgt n---a,t
 OA-12(1): cca tcg tgc cgt gaa
 OA-12(2): cca tcg tac cgt gaa
 OA-32(1): tgt cag gca aag gtg
 OA-32(2): tgt cag gta aag gtg
 OA-34(1): tca ggc aaa ggt gat
 OA-34(2): tca ggc aga ggt gat
 OA-39(1): caa agg tga tat atc
 OA-39(2): caa agg taa tat atc
 OA-44(1): gtg ata tat cac acc
 OA-44(2): gtg ata ttt cac acc
 OA-45(1): gat ata tca cac cat
 OA-45(2): gat ata tat cac acc
 OA-46(2): gat ata tta cac cat
 RBS-A(1): cgg cga gac gat agg
 RBS-A(2): cgg cga ggc gat agg
 RBS-C(2): cgg cga gat gat agg

RBS-T(1): cga tag gtt gtc ggg
 RBS-T(2): cga tag gat gtc ggg
 RBS-T(3): cga tag ggt gtc ggg
 KatG275(1): cgg taa gac cca tgg
 KatG275(2): cgg taa ggc cca tgg
 KatG833(1): gct gga gca gat ggg
 KatG833(2): gct gga gta gat ggg
 KatG848(1): ctt ggg ctg gaa gag
 KatG848(2): ctt ggg cgg gaa gag
 KatG315(1): atc acc agc ggc atc
 KatG315(2): atc acc acc ggc atc
 KatG315(3): atc acc aga ggc atc
 KatG328(1): acg aaa tgg gac aac
 KatG328(2): acg aaa ttg gac aac
 KatG328(3): acg aaa tgc gac aac
 KatG463(1): cag atc cgg gca tcg
 KatG463(2): cag atc ctg gca tcg
 KatG488(1): gcg aca agc gcg gcg
 KatG488(2): gcg aca atc gcg gcg
 KatG500(1): gcc tgc agc cac aag
 KatG500(2): gcc tgc acc cac aag

所说的引起乙胺丁醇抗药性的 *embB* 基因突变探针为:

EmbB306(1):	cct ggg cat ggc ccg	
EmbB306(2):	cct ggg cnt ggc ccg	n---g,c
EmbB306(3):	tgg gca tgg ccc gag	
EmbB306(4):	tgg gca tng ccc gag	n---a,t,c
EmbB330(1):	gga tcc ctt cgg ctg	
EmbB330(2):	gga tcc cgt cgg ctg	

所说的引起吡嗪酰胺抗药性的 *pncA* 基因突变探针为:

PncA55(1): atc gac ccg ggt gac
 PncA55(2): atc gac acg ggt gac
 PncA55(3): atc gac ccg gtg acc
 PncA57(1): ggg tga cca ctt ctc
 PncA57(2): ggg tga cga ctt ctc
 PncA63(1): cac acc gga cta ttc
 PncA63(2): cac acc gca cta ttc
 PncA68(1): tcg tcg tgg cca ccg
 PncA68(2): tcg tcg ttg cca ccg
 PncA69(1): tcg tgg cca ccg cat

PncA69(2): "tcg tgg cga ccg cat
 PncA72(1): acc gca ttg cgt cag
 PncA72(2): acc gca tcg cgt cag
 PncA76(1): cag cgg tac tcc cgg
 PncA76(2): cag cgg tcc tcc cgg
 PncA85(1): ccc agt ctg gac acg
 PncA85(2): ccc agt ccg gac acg
 PncA96(1): tct aca agg gtg cct
 PncA96(2): tct aca agg tgc cta
 PncA132(1): tgt ggt cgg tat tgc
 PncA132(2): tgt ggt cag tat tgc
 PncA137(1): acc gat cat tgt gtg
 PncA137(2): acc gat cgt tgt gtg
 PncA138(1): gat cat tgt gtg cgc
 PncA138(2): gat cat tat gtg cgc
 PncA139(1): cat tgt gtg cgc cag
 PncA139(2): cat tgt gcg cgc cag
 PncA141(1): gtg cgc cag acg gcc
 PncA141(2): gtg cgc ccg acg gcc
 PncA142(1): cgc cag acg gcc gag
 PncA142(2): cgc cag ang gcc gag n---a,t

- 3.如权利要求 2 所述的芯片，其特征在于探针的长度为 10~25 个碱基范围。
- 4.如权利要求 1~4 所述的任一芯片，其特征在于，设计荧光标记 PCR 引物扩增相关基因片段，所说的 PCR 引物为：

RpoB1: tcacaccgcagacgttgat
 RpoB2: cacgctcacgtgacagacc
 Rps1: ggtagatgccaaccatccag
 Rps2: tcttgacaccctgcgtatcc
 16S1: gggttctctcggattgacg
 16S2: cgagctctttacgcccagta
 16S3: gcagtaactgacgctgagga
 16S4: cgttgcatcgaattaatccac
 GyrA1: ggtgctctatgcaatgttcg
 GyrA2: gcttcggtgtacctcatcg
 OA1: attgatcgccaatggttagc

OA2: cccgctagcacctcttgg
InhA1: gtaaccccagtgcgaaagtt
InhA2: actgaacgggatacgaatgg
KatG1: catgaacgacgtcgaaacag
KatG2: ccgtacaggatctcgaggaa
KatG3: ccgagattgccagcctta
KatG4: aggggtgcgaatgaccttg
embB1: tgatattcggttcctgctc
embB2: gctgacatgggtcatcagc
PncA1: ggcggactaccatcacgtc
PncA2: ccgttctcgtcgactcctt
PncA3: tcgaaggagtcgacgagaac
PncA4: acacaccgctgtcaggt

权利要求书

1. 一种诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片, 其特征在于: 在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测遗传性贫血相关基因突变的特异 DNA 探针, 所说的探针为:

β 地中海贫血症

$\beta(27-28)1$	TGG TGA GGC CCT GGG CAG
$\beta(27-28)2$	GGT GAG GCC CCT GGG CAG
$\beta(43)1$	GGT TCT TTG AGT CCT TT
$\beta(43)2$	GGT TCT TTT AGT CCT TT
$\beta(42+T)2$	AGG TTC TTT TGA GTC CT
IVS(2-1)1	CTT CAG GGT GAG TCT
IVS(2-1)2	CTT CAG GAT GAG TCT
$\beta(1)1$	ACA GAC ACC ATG GTG CAC CT
$\beta(1)2$	ACA GAC ACC AGG GTG CAC CT
$\beta(8)1$	GAG GAG AAG TCT GCC
$\beta(8)2$	TGA GGA GGT CTG CCG
$\beta(8-9)2$	AGG AGA AGG TCT GCC
$\beta(37)1$	TAC CCT TGG ACC CAG
$\beta(37)2$	TAC CCT TAG ACC CAG
P(+40-43)1	GCA ACC TCA AAC AGA CA
P(+40-43)2	AGC AAC CTC AGA CAC CA
P($\beta 31$, IVS1)1	CAC CCT TAG GCT GCT GG
P(IVS1)2	CCC ACC CTG AGG CTG CT
$\beta(31)2$	CCC TTA GGT GCT GGT GG
P(cap+1)1	ATT GCT TAC ATT TGC
P(cap+1)2	ATT GCT TCC ATT TGC
$\beta(19)1$	AAG GTG AAC GTG GAT
$\beta(19)2$	AAG GTG AGC GTG GAT
$\beta(95+A)1$	CTG TGA CAA GCT GCA
$\beta(95+A)2$	TGT GAC AAA GCT GCA
IVS(2-5)1	AGG GTG AGT CTA TGG

IVS(2-5)2	AGG GTG ACT CTA TGG
$\beta(41-42)1$	CAG AGG TTC TTT GAG T
$\beta(41-42)2$	CAG AGG TTG AGT CCT T
IVS(2-654)1	GTT AAG GCA ATA GCA
IVS(2-654)2	GTT AAG GTA ATA GCA
$\beta(17)1$	CTG TGG GGC AAG GTG AAC
$\beta(17)2$	CTG TGG GGC TAG GTG AAC
$\beta(71-72)1$	TGC CTT TAG TGA TGG
$\beta(71-72)2$	TGC CTT TAA GTG ATG
$\beta(71-72)3$	TGC CTT TTA GTG ATG
IVS(1-5)1	CAG GTT GGT ATC AAG
IVS(1-5)2	CAG GTT GCT ATC AAG
IVS(1-1)1	TGG GCA GGT TGG TAT
IVS(1-1)2	TGG GCA GTT TGG TAT
$\beta(30)2$	CTG GGC GGG TTG GTA
P(-28)1	GGG CAT AAG AGT CAG
P(-28)2	GGG CAT AGG AGT CAG
P(-29)2	TGG GCA TGG AAG TCA
P(-30)1	CTG GGC ATA AAA GTC
P(-30)2	CTG GGC ACA AAA GTC
P(-31)2	GCT GGG CGT AAA AGT
P(-32)2	GGC TGG GAA TAA AAG
$\beta(14-15)1$	TAC TGC CCT GTG GGG CAA GG
$\beta(14-15)2$	TAC TGC CCT GGT GGG GCA AG
HbE(26)1	TGG TGG TGA GGC CCT
HbE(26)2	TGG TGG TAA GGC CCT

α 地中海贫血症, HbH, HbS, 和 HbM 血红蛋白异常

Constant Spring 突变

P(cs)1 ATA CCG TTA AGC TGG

P(cs)2 ATA CCG TCA AGC TGG

Quong SZE 突变

P(qs)1 GCC TCC CTG GAC AAG

P(qs)2 GCC TCC CCG GAC AAG

HbS 镰刀形贫血突变

P(hbs)1 ACT CCT GAG GAG AAG

P(hbs)2 ACT CCT GTG GAG AAG

Duan 突变

P(duan)1 GTG GAC GAC ATG CCC

P(duan)2 GTG GAC GCC ATG CCC

HbM 突变

P(hbm) 1 TAA GGG CCA CGG CAA

P(hbm) 2 TAA GGG CTA CGG CAA

P(hbm) 3 CGA CCT GCA CGC GCA

P(hbm) 4 CGA CCT GTA CGC GCA

P(hbm) 5 AAG AAA GTG CTC GGT

P(hbm) 6 AAG AAA GAG CTC GGT

P(hbm) 7 TGA GCT GCA CTG TGA

P(hbm) 8 TGA GCT GTA CTG TGA

P(hbm) 9 GAA GGC TCA TGG CAA

P(hbm) 10 GAA GGC TTA TGG CAA

说明书摘要

本发明公开了一种诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片，其特征在于：在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测遗传性贫血相关基因突变的特异 DNA 探针。本发明与现有技术相比，在一显微镜载玻片大小的载体表面，固定 70×4 DNA 探针，因此可同时检测遗传性贫血如 α ， β 地中海贫血症，血红蛋白异常等相关基因突变。具有平行分析和多重分析特点。特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。适合于早期诊断，产前筛查遗传性贫血。

说明书摘要

本发明公开了一种检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片。它是利用微机械阵列点样仪将检测各种疾病相关基因突变的 DNA 探针固定于玻片、硅片、膜、高分子材料载体上。本发明与现有技术相比，在一显微镜载玻片大小的载体表面固定了不同的 5' 末端氨基修饰 DNA 探针，因此可同时检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶相关基因突变。具有平行分析和多重分析的特性。分辨率和灵敏度高，适合于早期诊断 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症遗传性疾病。

说明书摘要

本发明公开了一种苯丙氨酸羟化酶基因突变诊断专用 DNA 芯片。它是在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测苯丙氨酸羟化酶基因突变的特异 DNA 探针, 形成中密度 DNA 探针阵列。本发明与现有技术相比, 在一显微镜载玻片大小的载体表面, 固定 79×4 DNA 探针, 因此可同时检测苯丙氨酸羟化酶已发现的中国人种所有基因突变。具有平行分析和多重分析特点。特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。适合于早期诊断, 产前筛查苯丙酮酸尿症。

说明书摘要

本发明公开了一种丙型肝炎病毒 HCV5'非编码区基因分型的生物芯片。它是在玻片、硅片、膜和高分子材料上固定我们设计的 28 种特异 DNA 探针，用来检测丙型肝炎病毒及其 30 多种亚型。本发明与现有技术相比，可以方便，快速地一次检测 30 种左右的丙型肝炎病毒的亚型，非常适合于临床的病毒基因分型。每一种病毒亚型有一种杂交信号模式，分辨率高，专一性强。一次测试能检测的病毒亚型数是现有技术中最多的。采用荧光分析方法，灵敏度高。

说明书

检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片

本发明涉及一种检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片。

结核杆菌引起的结核病是以呼吸道传播为主的慢性传染病，曾是危及人类生命的“第一杀手”。1882 年科赫（德国）发现了致病的病原菌——结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)，结核菌属于分枝杆菌属，分为人型、牛型、鸟型、鼠型等，对人类有致病能力的有人型和牛型，其中人型结核菌为人类结核病的主要病原菌（占 95% 以上），牛型结核菌次之，其它类型结核菌人类罕被感染。

结核^{杆菌}为长约 $1\sim 4\mu\text{m}$ 、宽约 $0.3\sim 0.6\mu\text{m}$ 、稍弯曲的细长杆菌，两端钝圆。抗酸染色呈红色，最适生长温度为 37°C ，在氧气丰富的环境生长良好。结核菌对外环境的抵抗力较强， 100°C 15 分钟或直接阳光下 2~3 小时才能将其杀死。

110 多年来，随着社会的文明进步，抗结核病药物的开发、预防疫苗的研发和应用，在全世界范围内结核病的发病率和死亡率均有明显下降。

但进入 80 年代中期，一度被人们已控制流行的结核病，近十年来发病率呈大幅上升的趋势。在全球范围内，结核病又呈肆虐人类之势，其中受害最重的仍为经济滞后的发展中国家。世界卫生组织宣布：全球已处于结核病紧急状态！结核病卷土重来，势头凶猛。每年死于结核病的人数已达到人类未发现链霉素等化学治疗药物前的水平。

据估计全球已有 17 亿人感染结核杆菌，约有 2000 万结核患者，每年新增病例 800 万，死亡达 300 万，为传染病死亡人数第一位。结核病又将可能成为“十痨九死”或“不治之症”。由于吸烟低龄化及女性化、环境污染加剧，免疫力下降，使年轻女性及老年结核患者死亡率上升。

结核病死灰复燃，全球呈大回升流行之势，究其原因有：一是结核杆菌的耐药性。由于链霉素、异烟肼、乙胺丁醇、利福平等 12 种国际通用抗结核药物长期使用，结核病疗程长的因素，自然界和患者体内已产生了对化学药物具抗

性的结核菌株，特别是多重耐药结核病流行，增大了治疗难度。二是结核病和艾滋病的双重感染。在全球范围内，结核病是目前 HTV 患者的头号杀手。几乎三分之一的 HTV 患者的死亡是由结核病造成的。三是由于结核杆菌传染途径和传染力极强，整个世界范围内的人口流动，使结核传染源得到传播。另外，早期发现感染致病有一定的难度，致使漏诊、误诊等。

许多研究资料证明，现今使用的卡介苗既不能预防原发性结核杆菌的感染，又不能预防大量传染性的肺结核发病，故不能明显地降低社区中的结核病传播。因此，不能寄希望于现行使用的卡介苗作控制结核病的主导措施，而只能作为一种辅助手段。国际经验表明，预防控制结核病，最有效的办法是对那些作为主要传染源的向外界排菌的肺结核病人实施有监督的化学治疗。

预防结核病的根本措施在于早期发现和早期治疗，这样既可以迅速消灭结核病的传染源，也有利于切断传染途径，没有治疗过的结核病人是最危险的传染原，而结核病患者一经接受药物治疗，其传染性可迅速降低。就目前的化学疗法水平来说，即便是大量排菌的初发结核病患者，经过合理化疗三个月内可以使大约 50% 的病人痰菌阴转，经过六个月的治疗，痰菌阴转率可达 90% 以上，这就使结核病的传染危险大为降低。因此，搜寻、发现和及时治疗新发生的结核病人，是预防结核病的头等重要的工作。

实践证明，结核杆菌的抗药性分型的所需时间非常长，因为结核杆菌生长非常缓慢，检测及抗药性分析一般需 6~8 周。本发明所说的抗药性分型是指引起异烟肼抗药性的 katG 基因、inhA 基因、oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域；引起利福平抗药性的 rpoB 基因；引起链霉素抗药性的 rpsL 基因和 rrs 基因；引起乙胺丁醇抗药性的 embB 基因；引起吡嗪酰胺抗药性的 pncA 基因和引起 Fluoroquinolones 抗药性的 gyrA 基因分型。结核杆菌的相关抗药性作用机制如下表：

药物	作用机制	基因	抗药性关联突变频率
异烟肼	抑制 mycolic acid 的生物合成	katG	42~58%
		inhA 基因	21~34%
		ahp C 基因	10~15%

利福平	抑制转录	rpoB 基因	96~98%
链霉素	抑制蛋白质合成	rpsL 基因	52~59%
		rrs 基因	8~21%
乙胺丁醇	抑制 arabinogalactan 和 lipoarabinomannan 的生物合成	embB 基因	47~65%
Fluoroquinolone	抑制 DNA gyrase	gyrA 基因	75~94%
吡嗪酰胺		pncA 基因	72~97%

注: katG: catalase-peroxidase; inhA: enoyl-acyl carrier protein reductase; ahp C: alkylhydroperoxide reductase; rpoB: subunit B of RNA polymerase; rpsL: ribosomal protein S12; rrs: 16S rRNA; embB: arabinosyl transferase; pncA: pyrazinamidase nicotinamidase; gyrA: DNA gyrase subunit A。

在现有技术中,结核杆菌的抗药性检测主要是检测分离培养的结核杆菌在不同浓度的不同抗菌药物的特定生长条件下的生长速度。经常使用的方法有平板扩散(disk diffusion)、培养液稀释(broth dilution)、琼脂稀释(agar dilution)和梯度扩散(gradient diffusion)等。因为结核杆菌生长非常缓慢,检测及抗药性分析一般需 6~8 周。由于抗药性的遗传机制的有关研究的大量报道,抗药性的基因检测正在成为临床实验室的一种方法(Franklin R Cockerill III, Gantimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(2), 199-212,1999)。现在结核杆菌抗药性相关基因突变检测方法主要有:(1) PCR-SSCP (single-stranded conformation polymorphism), SSCP 是指单链 DNA 分子在中性 PAGE 中电泳迁移率随其构象改变的性质。因此可作为基因变异的检测方法,最早由 Orita 用于癌基因点突变和人基因组多态性研究(Orita, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766, 1989),此法仅能检测基因变异的存在,而不能确定突变的部位和内容。以下文献报道了目前广泛应用于结核杆菌抗药性基因检测的方法:(Heym B et al., Mol. Microbiol. 15, 235-245, 1995; Rouse D. A. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 39, 2472-2477, 1995; Selvakumar N, et al., Curr. Sci. 73, 774-777, 1997; Sreevatsan S, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 41, 1677-1681, 1997; Telenti A, et al., J Clin Microbiol., 35, 719-

723, 1997; Temesgen Z, et al., Mol Cell. Probes, 11, 59-63, 1997; Whelen A. C, et al., J Clin Microbiol., 33, 556-561, 1995; Victor T. C, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 40, 1572, 1996); (2) PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism), 该方法利用多种限制性内切酶对基因扩增产物进行酶切, 不同的基因序列将产生不同的电泳图谱(Nachamkin I, et al., Clin Infect Dis., 24, 894-900, 1997; Cockerill F. R, et al., J Infect Dis., 171, 240-245, 1995; Haas W. H, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 41, 1601-1603, 1997)。该方法只能应用于当突变改变了某一酶切位点时; (3) PCR-LiPA(line probe assay)(Rossau R, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 41, 2093-2098, 1997), 该方法需进行同位素标记或地高辛, 生物素, 过氧化物酶等标记, 分析过程复杂, 不适宜快速分析; (4) DNA 测序法 Musser J. M, et al., J Infect Dis., 173, 196-202, 1996; Sreevatsan S, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 41, 600-606, 1997; William D. L, et al, Clin Infect Dis., 26, 446-450, 1998; Sreevatsan S, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 40, 1024-1026, 1996; Sreevatsan S, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 41, 636-640, 1997; Takiff H. E, et al., Antimicrob. Agents Chemother, 38, 773-780, 1994), 这是最直观, 最准确的方法。但技术复杂价格昂贵, 不能作为常规方法。

Affymetrix 公司研究开发了结核杆菌利福平抗药性基因芯片(A.Troesch et al., J of Clinical Microbiology, 37(1), 49-55, 1999; T.R.Gingeras et al., Genome Research, 8,435-448,1998), 该公司是利用光导 DNA 原位合成方法在硅片上合成特定的 DNA 探针的方法制作这种芯片。该芯片制作方法复杂, 设备要求高, 芯片杂交信号处理困难, 并且只能检测一种药物的抗药性。Orchid Biocomputer 公司开发了引物延伸序列扫描方法(S.R.Head et al., Molecular and Cellular Probes, 13, 81-87, 1999)检测结核杆菌利福平抗药性, 由于固相表面引物延伸仍然存在许多技术问题, 灵敏度及分辨率都较低, 难以大规模使用。

综上所述, 在结核杆菌抗药性相关基因突变诊断的现有技术中, 存在操作繁杂, 所需时间长, 成本较高, 难以自动化及大量样本平行分析等问题。

本发明的目的是针对现有技术的不足, 提出一种可同时检测结核杆菌所有抗药性相关基因突变的检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片。

本发明还涉及一种待检测样品的靶的基因或突变区域的 PCR 扩增引物。

实现本发明目的的技术方案如下所述：

所说的检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片，是一种在表面固定了检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的特异 DNA 探针的玻片、硅片、膜、高分子材料。

所说的探针为：

引起利福平抗药性的 *rpoB* 基因突变探针：

W1	gga gtt ctt cgg cac	
W2	cag cca gct gag cca	
W3	agc tga gcc aat tca	
W4	att cat gga cca gaa	
W5	tgg acc aga aca acc	
W6	caa ccc gct gtc ggg	
W7	ccg ctg tcg ggg tt	
W8	ggt tga ccc aca agc	
W9	ttg acc cac aag cgc	
W10	aag cgc cga ctg tcg	
W11	cga ctg tcg gcg ctg	
W12	tcg gcg ctg ggg ccc	
M1	gga gtt gtt cgg cac	
M2	cca gcc atc tga gcc	
M3	agc cag cng agc caa	n---c,g
M4	cca gct ggg cca att	
M5	cag ctg acc caa ttc	
M6	gct gag cna att cat	n---a,g
M7	ctg agc cna ttc atg	n---t,c
M8	agc caa ttc ttc atg	
M9	gcc aat tca tgt tca	
M10	cat gga caa ccc gct	
M11	gga cca gaa ccc gct	
M12	att cat gaa caa ccc	
M13	tgg acc acc cgc tgt	
M14	gct gag cat gga cca	
M15	ctg agc cac cag aac	
M16	aat tca tag acc aga	
M17	att cat gta cca gaa	
M18	ttc atg gtc cag aac	n---t,g
M19	tca tgg agc aga aca	
M20	caa ccc gat gtc ggg	

M21	ccc gct gcc ggg gtt	
M22	ccg ctg tng ggg ttg	n---t, a
M23	ggg ttg aac cac aag	
M24	gtt gac can caa gcg	n---t, g, a
M25	ttg acc cnc aag cgc	n---g, t, c
M26	tga ccc ana agc gcc	n---a, g
M27	aag cgc caa ctg tcg	
M28	ccg act gcc ggc gct	
M29	cga ctg tng gcg ctg	n---a, t, g
M30	gac tgt ctg cgc tgg	
M31	tcg gcg ccg ggg ccc	

引起链霉素抗药性的 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因突变探针:

S12-9(1):	ctg gtc cgc aag ggt
S12-9(2):	ctg gtc cac aag ggt
S12-43(1):	act ccg aag aag ccg
S12-43(2):	act ccg agg aag ccg
S12-88(1):	cgg gtg aag gac ctg
S12-88(2):	cgg gtg agg gac ctg
S12-88(3):	cgg gtg cag gac ctg
S12-93(1):	gcc tgg tgt gcg cta
S12-93(2):	gcc tgg tat gcg cta
16S-491(1):	gaa gaa gca ccg gcc
16S-491(2):	gaa gaa gta ccg gcc
16S-512(1):	gtg cca gca gcc gcg
16S-512(2):	gtg cca gta gcc gcg
16S-513(2):	gtg cca gct gcc gcg
16S-516(1):	cag cag ccg cgg taa
16S-516(2):	cag cag ctg cgg taa

16S-798(1):	tag tcc acg ccg taa	
16S-798(2):	tag tcc atg ccg taa	
16S-877(1):	ccg cct ggg gag tac	
16S-877(2):	ccg cct gag gag tac	
16S-904(1):	taa aac tca aag gaa	
16S-904(2):	taa aac tna aag gaa	n---a, g
16S-905(1):	aaa act caa agg aat t	
16S-905(2):	aaa act cga agg aat t	
16S-906(2):	aaa act cac agg aat t	

引起 Fluoroquinolones 抗药性的 *gyrA* 基因突变探针:

GyrA88(1):	ccc gca cgg cga cgc
GyrA88(2):	ccc gca ctg cga cgc

GyrA90(1):	' ggc gac gcg tcg atc	
GyrA90(2):	ggc gac gtg tcg atc	
GyrA91(1):	cga cgc gtc gat cta	
GyrA91(2):	cga cgc gcc gat cta	
GyrA94(1):	gat cta cga cag cct	
GyrA94(2):	gat cta cna cag cct	n---a,t,c
GyrA94(3):	gat cta cgn cag cct	n---c,g

引起异烟肼抗药性的 *katG* 基因、*inhA* 基因、*ahpC* 基因、*oxyR* 基因和

ahp C 基因的中间区域突变探针:

OA4(1):	ttt ggt tgc gac att	
OA4(2):	ttt ggt tac gac att	
OA-4(1):	gcg aca ttc cat cgt	
OA-4(2):	gcg aca tcc cat cgt	
OA-6(1):	gac att cca tcg tgc	
OA-6(2):	gac att cta tcg tgc	
OA-9(1):	att cca tcg tgc cgt	
OA-9(2):	att cca ttg tgc cgt	
OA-10(2):	att cca tcn tgc cgt	n---a,t
OA-12(1):	cca tcg tgc cgt gaa	
OA-12(2):	cca tcg tac cgt gaa	
OA-32(1):	tgt cag gca aag gtg	
OA-32(2):	tgt cag gta aag gtg	
OA-34(1):	tca ggc aaa ggt gat	
OA-34(2):	tca ggc aga ggt gat	
OA-39(1):	caa agg tga tat atc	
OA-39(2):	caa agg taa tat atc	
OA-44(1):	gtg ata tat cac acc	
OA-44(2):	gtg ata ttt cac acc	
OA-45(1):	gat ata tca cac cat	
OA-45(2):	gat ata tat cac acc	
OA-46(2):	gat ata tta cac cat	
RBS-A(1):	cgg cga gac gat agg	
RBS-A(2):	cgg cga ggc gat agg	
RBS-C(2):	cgg cga gat gat agg	
RBS-T(1):	cga tag gtt gtc ggg	
RBS-T(2):	cga tag gat gtc ggg	
RBS-T(3):	cga tag ggt gtc ggg	
KatG275(1):	cgg taa gac cca tgg	
KatG275(2):	cgg taa ggc cca tgg	
KatG833(1):	gct gga gca gat ggg	

KatG833(2): gct gga gta gat ggg
 KatG848(1): ctt ggg ctg gaa gag
 KatG848(2): ctt ggg cgg gaa gag
 KatG315(1): atc acc agc ggc atc
 KatG315(2): atc acc acc ggc atc
 KatG315(3): atc acc aga ggc atc
 KatG328(1): acg aaa tgg gac aac
 KatG328(2): acg aaa ttg gac aac
 KatG328(3): acg aaa tgc gac aac
 KatG463(1): cag atc cgg gca tcg
 KatG463(2): cag atc ctg gca tcg
 KatG488(1): gcg aca agc gcg gcg
 KatG488(2): gcg aca atc gcg gcg
 KatG500(1): gcc tgc agc cac aag
 KatG500(2): gcc tgc acc cac aag

引起乙胺丁醇抗药性的 *embB* 基因突变探针:

EmbB306(1):	cct ggg cat ggc ccg	
EmbB306(2):	cct ggg cnt ggc ccg	n---g, c
EmbB306(3):	tgg gca tgg ccc gag	
EmbB306(4):	tgg gca tng ccc gag	n---a, t, c
EmbB330(1):	gga tcc ctt cgg ctg	
EmbB330(2):	gga tcc cgt cgg ctg	

引起吡嗪酰胺抗药性的 *pncA* 基因突变探针:

PncA55(1): atc gac ccg ggt gac
 PncA55(2): atc gac acg ggt gac
 PncA55(3): atc gac ccg gtg acc
 PncA57(1): ggg tga cca ctt ctc
 PncA57(2): ggg tga cga ctt ctc
 PncA63(1): cac acc gga cta ttc
 PncA63(2): cac acc gca cta ttc
 PncA68(1): tcg tcg tgg cca ccg
 PncA68(2): tcg tcg ttg cca ccg
 PncA69(1): tcg tgg cca ccg cat
 PncA69(2): tcg tgg cga ccg cat
 PncA72(1): acc gca ttg cgt cag
 PncA72(2): acc gca tcg cgt cag
 PncA76(1): cag cgg tac tcc cgg
 PncA76(2): cag cgg tcc tcc cgg
 PncA85(1): ccc agt ctg gac acg

PncA85(2):	ccc agt cgg gac acg	
PncA96(1):	tct aca agg gtg cct	
PncA96(2):	tct aca agg tgc cta	
PncA132(1):	tgt ggt cgg tat tgc	
PncA132(2):	tgt ggt cag tat tgc	
PncA137(1):	acc gat cat tgt gtg	
PncA137(2):	acc gat cgt tgt gtg	
PncA138(1):	gat cat tgt gtg cgc	
PncA138(2):	gat cat tat gtg cgc	
PncA139(1):	cat tgt gtg cgc cag	
PncA139(2):	cat tgt gcg cgc cag	
PncA141(1):	gtg cgc cag acg gcc	
PncA141(2):	gtg cgc cgg acg gcc	
PncA142(1):	cgc cag acg gcc gag	
PncA142(2):	cgc cag ang gcc gag	n--a,t

这些设计的探针的长度可以有一定的增加或减少，一般在 10~25 个碱基范围。

本发明与现有技术相比，在一显微镜载玻片表面，固定 160 × 2 DNA 探针，因此一次可同时检测引起结核杆菌抗药性相关基因----引起异烟肼抗药性的 katG 基因、inhA 基因、oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域；引起利福平抗药性的 rpoB 基因；引起链霉素抗药性的 rpsL 基因和 rrs 基因；引起乙胺丁醇抗药性的 embB 基因；引起吡嗪酰胺抗药性的 pncA 基因和引起 Fluoroquinolones 抗药性的 gyrA 基因的常见基因突变。同时具有平行分析和多重分析的特性。结核杆菌抗药性相关基因突变的检测可缩短至 1 天内完成。开发的检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片可检测 116 种常见抗药性突变位点，包括 katG 基因的 10 种突变位点(SEQ ID 7)； inhA 基因的 4 种突变位点(SEQ ID 6)； oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域的 13 种突变位点(SEQ ID 5)； rpoB 基因的 43 种突变位点(SEQ ID 1)； rpsL 基因的 5 种突变位点(SEQ ID 2)； rrs 基因的 10 种突变位点(SEQ ID 3)； embB 基因的 6 种突变位点(SEQ ID 8)； pncA 基因的 17 种突变位点(SEQ ID 9)和 gyrA 基因的 8 种突变位点(SEQ ID 4)。所需时间为一天。生产成本少于 30 元。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

图 1 是检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片模式图。

图 2 是一种利福平抗药性结核杆菌的杂交结果图。

图 3 是一种异烟肼抗药性结核杆菌的杂交结果图。

图 4 是一种链霉素抗药性结核杆菌的杂交结果图。

图 1 中:

黑色点阵为野生型探针; 白色点阵为突变型探针。由图 1 可见, 该基因芯片包括:

①利福平抗药性分型区域阵列 1, 野生型探针从左到右分别是 W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7、W8、W9、W10、W11 和 W12; 突变型探针从左到右, 从上到下分别是 W1、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、M10、M11、W1、M12、M13、M14、M15、M16、M17、M18、M19、M20、M21、M22、W1、M23、M24、M25、M26、M27、M28、M29、M30 和 M31;

②异烟肼抗药性分型区域阵列 2, 上排野生型探针从左到右分别 OA4 (1)、OA-4 (1)、OA-6 (1)、OA-9 (1)、OA-9 (1)、OA-12 (1)、OA-32 (1)、OA-34 (1)、OA-39 (1)、OA-44 (1)、OA-45 (1)、OA-45 (1); 上排突变型探针从左到右分别是 OA4 (2)、OA-4 (2)、OA-6 (2)、OA-9 (2)、OA-10 (2)、OA-12 (2)、OA-32 (2)、OA-34 (2)、OA-39 (2)、OA-44 (2)、OA-45 (2)、OA-46 (2); 下排野生型探针从左到右分别 KatG275 (1)、KatG833 (1)、KatG848 (1)、KatG315 (1)、KatG328 (1)、KatG463 (1)、KatG488 (1)、KatG500 (1)、RBS-A (1)、RBS-T (1)、KatG315 (3)、KatG328 (3); 下排突变型探针从左到右分别是 KatG275 (2)、KatG833 (2)、KatG848 (2)、KatG315 (2)、KatG328 (2)、KatG463 (2)、KatG488 (2)、KatG500 (2)、RBS-A (2)、RBS-T (2)、RBS-C (2)、RBS-T (3);

③链霉素和 Fluoroquinolones 抗药性分型区域阵列, 上排野生型探针

从左到右分别是 16S-491(1)、16S-512(1)、16S-512(1)、16S-516(1)、16S-798(1)、16S-877(1)、16S-904(1)、16S-905(1)、16S-905(1)、S12-9(1)；上排突变型探针从左到右分别是 16S-491(2)、16S-512(2)、16S-513(2)、16S-516(2)、16S-798(2)、16S-877(2)、16S-904(2)、16S-905(2)、16S-906(2)、S12-9(2)；下排野生型探针从左到右分别是 S12-43(1)、S12-88(1)、S12-88(1)、S12-93(1)、GyrA88(1)、GyrA90(1)、GyrA91(1)、GyrA94(1)、GyrA94(1)；下排突变型探针从左到右分别是 S12-43(2)、S12-88(2)、S12-88(3)、S12-93(2)、GyrA88(2)、GyrA90(2)、GyrA91(2)、GyrA94(2)、GyrA94(3)；

④吡嗪酰胺和乙胺丁醇抗药性分型区域阵列，上排野生型探针从左到右分别 PncA55(1)、PncA55(1)、PncA57(1)、PncA63(1)、PncA68(1)、PncA69(1)、PncA72(1)、PncA76(1)、PncA85(1)、PncA96(1)；上排突变型探针从左到右分别是 PncA55(2)、PncA55(3)、PncA57(2)、PncA63(2)、PncA68(2)、PncA69(2)、PncA72(2)、PncA76(2)、PncA85(2)、PncA96(2)；下排野生型探针从左到右分别 PncA132(1)、PncA137(1)、PncA138(1)、PncA139(1)、PncA141(1)、PncA142(1)、EmbB306(1)、EmbB306(1)、EmbB306(1)、EmbB330(1)；下排突变型探针从左到右分别是 PncA132(2)、PncA137(2)、PncA138(2)、PncA139(2)、PncA141(2)、PncA142(2)、EmbB306(2)、EmbB306(3)、EmbB306(4)、EmbB330(2)；

本发明的目的是这样实现的：将涉及的特异性探针固定于一种载体如载玻片、硅片、膜和高分子材料表面。用表面阵列的特异性 DNA 探针杂交方法

来检测引起结核杆菌抗药性的所有相关基因突变。

探针设计：选取结核杆菌抗药性 *katG* 基因的 10 种突变位点、*inhA* 基因的 4 种突变位点、*oxyR* 基因和 *ahp C* 基因的中间区域的 13 种突变位点、*rpoB* 基因的 43 种突变位点、*rpsL* 基因的 5 种突变位点、*rrs* 基因的 10 种突变位点、*embB* 基因的 6 种突变位点、*pncA* 基因的 17 种突变位点和 *gyrA* 基因的 8 种突变位点，合成相对应的野生型和突变型 DNA 探针，固定于载体表面。

检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片的构建：合成以上 160 种 DNA 探针，5'末端用氨基或其它活性基团修饰。每种探针重复 3 次固定于载体的活性表面，构建检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片。

样品处理：用设计的 PCR 引物扩增待检测样品的靶的基因或突变区域，荧光标记可以用 PCR 引物末端标记或 PCR 扩增时加入荧光标记的 dNTP。设计的 PCR 引物是：

RpoB1:	tcacaccgcagacgttgat
RpoB2:	cacgctcacgtgacagacc
Rps1:	ggtagatgccaaacctccag
Rps2:	tcttgacaccctgcgtatcc
16S1:	gggttctctcggattgacg
16S2:	cgagctctttacgcccagta
16S3:	gcagtaactgacgctgagga
16S4:	cgttgcatcgaattaatccac
GyrA1:	ggtgctctatgcaatgttcg
GyrA2:	gcttcggtgtacctcatcg
OA1:	attgatcgccaatggtagc
OA2:	ccggctagcacctcttgg
InhA1:	gtaaccccagtcgaaagtt
InhA2:	actgaacgggatacgaatgg
KatG1:	catgaacgacgtcgaaacag

KatG2: ccgtacaggatctcgaggaa
 KatG3: ccgagattgccagccta
 KatG4: aggggtcgaatgaccttg
 embB1: tgatattcggttcctgctc
 embB2: gctgacatgggtcatcagc
 PncA1: ggccgactaccatcacgtc
 PncA2: ccgttctcgtcgactcctt
 PncA3: tcgaaggagtcgacgagaac
 PncA4: acacacccgctgtcaggt

芯片表面杂交：荧光标记的 PCR 扩增产物在一定的条件下与检测引起结核杆菌抗药性的相关基因突变的 DNA 芯片表面的 DNA 探针杂交，用特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。

杂交信号检测：杂交洗脱后用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号；从而可以检测结核杆菌抗药性 katG 基因的 10 种突变位点、inhA 基因的 4 种突变位点、oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域的 13 种突变位点、rpoB 基因的 43 种突变位点、rpsL 基因的 5 种突变位点、rrs 基因的 10 种突变位点、embB 基因的 6 种突变位点、pncA 基因的 17 种突变位点和 gyrA 基因的 8 种突变位点。

实施例 1

现结合附图 1 和图 2 介绍本发明的实施例 1。利用本发明的芯片检测利福平抗药性结核杆菌。取分离培养的结核杆菌溶液 1 毫升，利用商业化的 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测结核杆菌基因组 DNA，用设计的 PCR（聚合酶链式反应）引物 RpoB1:tcacaccgcagacgttgat 和 RpoB2: Cy5-cacgctcacgtgacagacc 对 rpoB 基因片段进行扩增。扩增的体积为 100 μ l，PCR 产物中，加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的-20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70% 乙醇洗涤沉淀，干燥。

DNA 芯片表面杂交过程：

[illegible]

用荧光扫描仪 GSI Lumonics Inc(Watertown,MA)的 ScanArray5000 检测 DNA 芯片杂交信号。结果如图 2。结果显示,待测结核杆菌是一种带有 *rpoB* 基因 Ser531Leu 突变的利福平抗药性结核杆菌。

现结合附图 1 和图 3 介绍本发明的实施例 2。利用本发明的芯片检测异烟肼抗药性结核杆菌。取分离培养的结核杆菌溶液 1 毫升，利用商业化的 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测结核杆菌基因组 DNA，用设计的 PCR（聚合酶链式反应）引物 KatG1: catgaacgacgtcgaaacag；KatG2: Cy5-ccgtacaggatctcgaggaa 和 KatG3: ccgagattgccagcctta；KatG4: Cy5-agggtgcgaatgaccttg 对 katG 基因、InhA1: gtaaccccgatgcgaaagt 和 InhA2: Cy5-actgaacgggatacgaatgg 对 inhA 基因、OA1: attgatcgccaatggtagc 和 OA2: Cy5-ccggctagcacctcttgg 对 oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域片段进行扩增。扩增的体积分别为 50 μ l，混合 PCR 产物，加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70%乙醇洗涤沉淀，干燥。

杂交信号检测:

实施例 3

14

盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测结核杆菌基因组 DNA, 用设计的 12 组 PCR (聚合酶链式反应) 引物对 katG 基因、inhA 基因、oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域、rpoB 基因、rpsL 基因、rrs 基因、embB 基因、pncA 基因和 gyrA 基因进行扩增。扩增的体积分别为 50 μ l, 混合 PCR 产物, 加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液, 加入 2.5 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇, 混匀后, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 用 70%乙醇洗涤沉淀, 干燥。

DNA 芯片表面杂交过程:

5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 冷却至室温, 滴加于 DNA 芯片表面, 再盖上载玻片, 42 $^{\circ}$ C 杂交 4~8 小时。

杂交信号检测:

用荧光扫描仪 GSI Lumonics Inc(Watertown,MA)的 ScanArray5000 检测 DNA 芯片杂交信号。结果如图 4。从芯片杂交结果图 4 可以知道待测结核杆菌是 rpsL 的 K88Q 突变, 具有链霉素抗药性。

基因序列表:

(1) SEQ ID 1:

rpoB (β subunit of RNA polymerase)基因片段(GenBank L27989)及突变位点(阴影位点):

```
tc
acaccgcaga cgttgatcaa catccggccg gtggtcgccg
cgatcaagga gttCttcggc-aeagccaGc TgAGcCAatt
eatGGACcag aacaaccgcG tgTCgggggtt gaCcCACaag
cgccGactgT CGgcgcTggg gcccggcggg ctgtcacgtg
agcgtg
```

(2) SEQ ID 2:

rpsL (核糖体蛋白 S12)基因片段(GenBank L08011)及突变位点(阴影位点):

```
Cggtagatgccaaaccatccagcagctggtccgcaagggtcgtcgggacaagatcagtaag
gtcaagaccgcgggtctgaagggcagccgcagcgtcgtggtgtatgcaccgcgtgtac
accaccactccgaagaagccgaactcggcgcttcggaaggttgcccgcggtgaagttgacg
agtcagggtcgaggtcacggcggtacattcccggcgagggccacaacctgcaggagcactcg
atggtgctggtgcgcggcgccgggtgaaggacctgcctggtgtgctgctacaagatcatc
cgcggttcgctggatacgcagggtgtcaagaaccgcaaacaggcacgcagccggttacggc
```

(3) SEQ ID 3:

rrs (16s rRNA)基因片段(GenBank X52917)及突变位点(阴影位点):

gCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCCGGGT
TCTCTCGGATTGACG]GTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAAT]TACTGGGCGTAAAGAGCTCG]TAGGTGGT

GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG]GCAGTAACCTGACGCTGAGGA]GCGAAAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACCGTGGGTACTAG
GTGTGGGTTTCTTCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGCGGAG
CAT]GTGGATTAATTGATGCAACG]CGAAGAACCCTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACG

(4) SEQ ID 4:

gyrA (A subunit of DNA gyrase)基因片段(GenBank L27512)及突变位点(阴影位点):

TCGCCG]GGTGCTCTATGCAATGTTCTG]ATTCCGGCTTCGCCCGGACCGCAGCCACGCCA
GTCCGCCCGGTCCGGTTGCCGAGACCATGGGCAACTACCACCCGCACGGCGACGCGT]CGAT
CTACGACAGCCTGGTGCGCATGGCCAGCCCTGGTCCGTGCGCTACCCGCTGGTGGACGG
CCAGGGCAACTTCGGCTCGCCAGGCAATGACCCACCGGCGG]CGATGAGGTACACCGAAGC

(5) SEQ ID 5:

oxyR 基因和 ahp C 基因的中间区域片段(GenBank U16243)及突变位点(阴影位点):

TGGTAGGCGGGGA]ATTGATCGCCAATGGTTAG]AGTGGCATGACTCTCCTCATCATCAAA
GCGGACAATGCATTTGGTTGCGACATTCCATCGTGCCGTGAAGTCGCTGTCAGGCAAGG
TGATATATCACACCATATTTATCGGCATCGCCG]CCAAGAGGTGCTAGCCGG]CCGTGGCCG

(6) SEQ ID 6:

inhA 基因调控区域片段(GenBank U41388)及突变位点(阴影位点):

GC]GTAACCCCAAGTGC]GAAAGTT]CCCGCCGGAAATCGCAGCCACGTTACGTCGTGGACAT
ACCGATTTCGGCCCGGCGCGGCGAGACGATAGGTTGTGCGGGTGACTGCCACAGCCACT
GAAGGGGCCAAACCC]CCATTGCTATCCCGTT]CAGT]CCTGGTTACCGGAGGAAACCGGGGG

(7) SEQ ID 7:

KatG(catalase-peroxidase)基因片段(GenBank X68081)及突变位点(阴影位点):

Catggccgcggcggtcgcacattcgcgagacgtttcggcgcatggc[catgaacgacgtcga]
[aacag]cggcgctgatcgtcggcggtcacactttcggtaagaccatggcgccggccggc
cgatctggtcggccccgaaccgcgaggtgctccgctggagcagatgggcttgggctggaa
gagctcgtatggcaccggaaccggtaaggacgcgatcaccagcggcatcgaggtcgtatg
gacgaacaccccgacgaaatgggacaacagt[ttcctcgagatcctgtacgg]ctacgagtg

Ggtccctgcggtcagccacgacctcgtcggcggaag[ccgagattgccagcctta]agagcca
gatccgggcatcgggattgactgtctcacagctagtttcgaccgcatggcgggcgggcgtc
gtcgttcggtggtagcgacaagcgcggcgggcgccaacgggtggtcgcatccgcctgcagcc
acaagtcgggtgggaggtcaacgaccccgacgggggatctgcg[caaggtcattcgcaccct]

(8) SEQ ID 8:

embB 基因片段(GenBank U68480)及突变位点(阴影位点):

Ggtccctgcggtcagccacgacctcgtcggcggaag[ccgagattgccagcctta]agagcca
gatccgggcatcgggattgactgtctcacagctagtttcgaccgcatggcgggcgggcgtc
gtcgttcggtggtagcgacaagcgcggcgggcgccaacgggtggtcgcatccgcctgcagcc
acaagtcgggtgggaggtcaacgaccccgacgggggatctgcg[caaggtcattcgcaccct]

(9) SEQ ID 9:

pncA (pyranzinamidase)基因片段(GenBank U59967)及突变位点(阴影位点):

gtaaccggtggcgccgcgctggcccgcgccatcagcgactacctggccgaagc[ggcggac]
[taccatcacgtc]gtggcaaccaaggacttccacatcgaccgggtgaccacttctccggc
acaccggactattcctcgtcgtggccaccgcattcggtcagcggta[ctcccggcgcgga
tccatcccagtc]tggaacgctcggcaatcgaggcgggtgttctacaagggtgcctacacc
ggagcgtacagcggcttcg[aaggagtcgacgagaacgg]cacgccactgctgaattggctg

ggagcgtacagcggct[tcgaaggagtcgacgagaac]ggcacgccactgctgaattggctg
cggcaacgcggcgctcgatgaggtcgatgtggtcggattgccaccgatcattgtgtgcgc
cagacggccgaggacgcggtacgcaatggcttggccaccagggtgctgggtgg[acctgaca]
[gcgggtgtgt]cggccgataaccacgctcgccgcgctggaggagatgcgcaccgccagcgtc

说明书

诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片

本发明涉及一种诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片。

中国是一个遗传病大国。遗传病是由于人体生殖细胞或受精卵的遗传物质发生改变而引起的疾病，从亲代传至后代。通常包括三大类：单基因遗传病，染色体遗传病和多基因遗传病。从世界范围讲，新生儿中至少 2% 有明显的先天异常。虽然大多数遗传病的发病率低(多基因病除外)。然而遗传病种类繁多，因此总数很多。仅单基因遗传病就有 4000 多种，染色体病有 100 多种，多基因病也不少于 100 种。并且目前国际上以平均每年发现 100 多种新单基因遗传病的速度在发展。这也反应了遗传病带给医学，社会和家庭问题的严重性。

绝大多数遗传病目前还没有有效的治疗方法，因此预防就显得尤为重要。若能在妊娠早期诊断出胎儿是否患病，对患病胎儿进行人工流产，可防止患儿出生。产前遗传筛检，辅以人工流产，已证明是一种有效预防严重危害健康的遗传病的方法。我国现有残疾人 5000 万，其中相当数量是遗传病引起的。由于边远地区和某些农村近亲结婚率高，遗传病发病率仍呈现上升趋势，因此广泛开展产前遗传筛检，杜绝患儿出生，降低发病率，对于我国优生优育，提高人口素质起着重要作用。

由于许多遗传病特别是单基因孟德尔型遗传病的基因及基因突变的机制已研究清楚，使我们在基因水平能准确诊断大部分遗传病。在许多发达国家，新生婴儿的遗传筛检很普遍。例如早在 60 年代，美国法律已规定必须对所有新生婴儿进行苯丙酮酸尿症的筛检。彻底消除了因苯丙酮酸尿症引起的智能障碍儿童的出现。因为如果苯丙酮酸尿症婴儿在出生时便能及时接受特别食谱治疗，就不会出现疾病症状。另外针对特定的新生儿遗传筛检，如针对黑人婴儿的镰刀血球细胞症，犹太婴儿的戴萨克斯症等都已普遍实施。但在中国，由于遗传病种类繁多，传统遗传筛检方法需要较昂贵的仪器，专业人才，高费用等，使我国在产前产后遗传筛检普及方面做得非常不够。这对中国的可持续发展问题，人口素质提高问题，社会保障负担问题都有非常深远的影响。举例来说，苯丙酮酸尿症是由于肝脏苯丙氨酸羟化酶严重缺乏所致的常染色体隐性遗传病。患者由于苯丙氨酸羟化酶缺乏或不足，造成苯丙氨酸不能按其正常代谢途径转化为酪氨酸，使得苯丙氨酸代谢物在体内大量蓄积，损坏患者的神经系统发育，而导致智力发育障碍。在欧美地区发病率为 1/10000，在我国是 1/16000。

在产前遗传筛检和人工流产结合, 控制遗传病发病率最成功的事例是地中海地区对 β 地中海贫血症的控制。地中海贫血是一种遗传性溶血性贫血, 是最常见和发病率最高的一种单基因遗传病。在地中海地区, 美国黑人, 东南亚, 印度次大陆和中国南方(广东, 广西, 海南, 贵州, 四川等省)发病率较高。世界卫生组织在 1985 年预测到本世纪末全世界将有 7%的人口携带血红蛋白病的遗传基因。据统计资料, 广东省 α 地中海贫血发病率 5.15%, β 地中海贫血 3%; 广西省南宁地区 α 地中海贫血发病率 14.9%, 个别地区高达 26%; 海南省有些地区 α 地中海贫血发病率 4.8%, β 地中海贫血 16.8~24.9%; 香港 α 地中海贫血发病率 3%, β 地中海贫血 6%; 澳门 α 地中海贫血发病率 6.2%, β 地中海贫血 3.4%等。由于目前对地中海贫血的治疗没有特效的方法, 最根本的措施是产前诊断, 杜绝患儿出生, 以达到预防和优生的目的。从 1975 年以来, 地中海地区的塞浦路斯, 意大利, Sardinia, 和希腊成功地实施了产前遗传筛检和选择性人工流产方法, 现在地中海贫血的发病率显著下降了 5 倍以上。

因为遗传病种类多, 每种遗传病所相关基因突变也多。传统的遗传病诊断方法费时费力, 且价格昂贵, 不适合在中国进行全国性的产前遗传筛检。在现有技术中, α 和 β 地中海贫血症, 镰刀性贫血症, 血红细胞异常和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症等遗传性贫血的诊断主要是利用相关基因突变检测和酶活性分析方法。疾病相关基因突变的检测主要有(1) PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism), 该方法利用多种限制性内切酶对基因扩增产物进行酶切, 不同的基因序列将产生不同的电泳图谱(Mercier, B. et al., Eur. J. Immunogenetics, 21, 105, 1994)。该方法只能应用于当突变改变了某一酶切位点时。该方法的改进是在突变位点引入酶切位点法, 即 PCR-AIRS(attificial introduction of restriction sites)(Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993)。(2) PCR-SSO(sequence specific oligonucleotide)或 PCR-ASO(allele specific oligonucleotide)(Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993; Saiki, R. K. et al., Nature, 324, 163, 1986), 待测基因经 PCR 扩增后, 分别与 15-20bp 标记的野生型和突变型探针杂交。该方法需进行同位素标记或地高辛, 生物素, 过氧化物酶等标记, 分析过程复杂, 不适宜快速分析。(3) PCR-SSP(sequence specific primers)或 ASPCR(allele specific PCR), 其原理是根据已知突变位点的性质在引物中设计一错配碱基, 使之仅能扩增突变型或野生型基因。该方法较为快速简便。(Wu, D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2757, 1989; Rust, S., et al., Nucleic Acids Research, 21, 3623, 1993; Newton, R. et al., Nucleic Acids Research, 17, 2503, 1989)。(4) PCR-SSCP (single-stranded

conformation polymorphism), SSCP 是指单链 DNA 分子在中性 PAGE 中电泳迁移率随其构象改变的性质。因此可作为基因变异的检测方法, 最早由 Orita 用于癌基因点突变和人基因组多态性研究(Orita, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766, 1989), 此法仅能检测基因变异的存在, 而不能确定突变的部位和内容。(5) DNA 测序法, 这是最直观, 最准确的方法。但技术复杂价格昂贵, 不能作为常规方法。

综上所述, 在有关疾病相关基因突变诊断的现有技术中, 存在操作繁杂, 所需时间长, 成本较高, 难以自动化及大量样本平行分析等问题。

本发明的目的是提供一种可同时检测遗传性贫血所有相关基因突变的诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片。

为了达到上述目的本发明采取下列措施:

诊断遗传性贫血相关基因突变的 DNA 芯片, 它是在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测遗传性贫血相关基因突变的特异 DNA 探针, 所说的探针为:

β 地中海贫血症

β (27-28)1	TGG TGA GGC CCT GGG CAG
β (27-28)2	GGT GAG GCC CCT GGG CAG
β (43)1	GGT TCT TTG AGT CCT TT
β (43)2	GGT TCT TTT AGT CCT TT
β (42+T)2	AGG TTC TTT TGA GTC CT
IVS(2-1)1	CTT CAG GGT GAG TCT
IVS(2-1)2	CTT CAG GAT GAG TCT
β (1)1	ACA GAC ACC ATG GTG CAC CT
β (1)2	ACA GAC ACC AGG GTG CAC CT
β (8)1	GAG GAG AAG TCT GCC
β (8)2	TGA GGA GGT CTG CCG
β (8-9)2	AGG AGA AGG TCT GCC
β (37)1	TAC CCT TGG ACC CAG
β (37)2	TAC CCT TAG ACC CAG
P(+40-43)1	GCA ACC TCA AAC AGA CA
P(+40-43)2	AGC AAC CTC AGA CAC CA
P(β 31, IVS1)1	CAC CCT TAG GCT GCT GG

P(IVS1)2	CCC ACC CTG AGG CTG CT
β(31)2	CCC TTA GGT GCT GGT GG
P(cap+1)1	ATT GCT TAC ATT TGC
P(cap+1)2	ATT GCT TCC ATT TGC
β(19)1	AAG GTG AAC GTG GAT
β(19)2	AAG GTG AGC GTG GAT
β(95+A)1	CTG TGA CAA GCT GCA
β(95+A)2	TGT GAC AAA GCT GCA
IVS(2-5)1	AGG GTG AGT CTA TGG
IVS(2-5)2	AGG GTG ACT CTA TGG
β(41-42)1	CAG AGG TTC TTT GAG T
β(41-42)2	CAG AGG TTG AGT CCT T
IVS(2-654)1	GTT AAG GCA ATA GCA
IVS(2-654)2	GTT AAG GTA ATA GCA
β(17)1	CTG TGG GGC AAG GTG AAC
β(17)2	CTG TGG GGC TAG GTG AAC
β(71-72)1	TGC CTT TAG TGA TGG
β(71-72)2	TGC CTT TAA GTG ATG
β(71-72)3	TGC CTT TTA GTG ATG
IVS(1-5)1	CAG GTT GGT ATC AAG
IVS(1-5)2	CAG GTT GCT ATC AAG
IVS(1-1)1	TGG GCA GGT TGG TAT
IVS(1-1)2	TGG GCA GTT TGG TAT
β(30)2	CTG GGC GGG TTG GTA
P(-28)1	GGG CAT AAG AGT CAG
P(-28)2	GGG CAT AGG AGT CAG
P(-29)2	TGG GCA TGG AAG TCA
P(-30)1	CTG GGC ATA AAA GTC
P(-30)2	CTG GGC ACA AAA GTC
P(-31)2	GCT GGG CGT AAA AGT
P(-32)2	GGC TGG GAA TAA AAG
β(14-15)1	TAC TGC CCT GTG GGG CAA GG

β (14-15)2 TAC TGC CCT GGT GGG GCA AG
 HbE(26)1 TGG TGG TGA GGC CCT
 HbE(26)2 TGG TGG TAA GGC CCT

α 地中海贫血症, HbH, HbS, 和 HbM 血红蛋白异常

Constant Spring 突变

P(cs)1 ATA CCG TTA AGC TGG

P(cs)2 ATA CCG TCA AGC TGG

Quong SZE 突变

P(qs)1 GCC TCC CTG GAC AAG

P(qs)2 GCC TCC CCG GAC AAG

HbS 镰刀形贫血突变

P(hbs)1 ACT CCT GAG GAG AAG

P(hbs)2 ACT CCT GTG GAG AAG

Duan 突变

P(duan)1 GTG GAC GAC ATG CCC

P(duan)2 GTG GAC GCC ATG CCC

HbM 突变

P(hbm)1 TAA GGG CCA CGG CAA

P(hbm)2 TAA GGG CTA CGG CAA

P(hbm)3 CGA CCT GCA CGC GCA

P(hbm)4 CGA CCT GTA CGC GCA

P(hbm)5 AAG AAA GTG CTC GGT

P(hbm)6 AAG AAA GAG CTC GGT

P(hbm)7 TGA GCT GCA CTG TGA

P(hbm)8 TGA GCT GTA CTG TGA

P(hbm)9 GAA GGC TCA TGG CAA

P(hbm)10 GAA GGC TTA TGG CAA

本发明与现有技术相比, 在一显微镜载玻片大小的载体表面, 固定 70×4 DNA 探针, 因此可同时检测遗传性贫血相关基因突变。具有平行分析和多重分析特点。特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。适合于早期诊断, 产前筛查遗传性贫血。同一芯片可同时检测导致中国人种遗传性贫血所有基因突变位点, 如 β 地中海贫血症, 包括 β 41-42(-TCTT), IVS2-654(C-T),

$\beta 17(A-T)$, $-28(A-G)$, $\beta 71-72(+A$ 或 $+T)$, $IVS1-5(G-C)$, $-30(T-C)$, $\beta 14-15(+G)$, $IVS1-1(G-C)$, $HbE26(G-A)$, $\beta 27-28(+C)$, $-29(A-G)$, $\beta 43(G-T)$, $IVS2-1(G-T)$, $\beta 1(T-G)$, $IVS(2-5)$, $\beta(30)$, -31 , -32 , $\beta(31)$, $cap+1$, $\beta(19)$, $\beta(95+A)$, $\beta(42+T)$, $\beta(1)$, $\beta(8)$, $\beta(8-9)$, $+40-43$, $\beta(37)$, $\beta(31)$ 突变; 血红蛋白异常的 Constant Spring(T-C), Quong SZE(T-C), $HbS(\beta 6 A-T)$, Duan($\alpha 75 A-C$), $HbM(\alpha 58 C-T, \alpha 87 C-T, \beta 68 T-A, \beta 93 C-T, \beta 64 C-T)$ 突变。开发中国常见遗传病诊断基因芯片将是最好的产前遗传筛检方法。设计中国最常见的几种遗传性贫血疾病, 例如地中海贫血, 血红蛋白异常等的基因的中国发生率最高的几种突变检测探针, 通过自动化微控制技术将其按一定的阵列顺序固定在芯片上, 构建中国常见遗传性贫血诊断基因芯片。如果全国广泛采用该技术进行全面的产前遗传筛检, 结合选择性的人工流产, 从而彻底杜绝严重影响身体健康的遗传性贫血的出现, 对提高我国人口素质, 减轻社会家庭的负担具有重要的意义。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

图 1 是遗传性贫血诊断 DNA 专用芯片模式图;

图 2 是检测 $\beta 14-15(+G)$, 突变的地中海贫血患者的结果模式图;

图 3 是检测 $\beta 14-15(+G)$ 突变的地中海贫血患者的杂交结果图;

图 4 是检测 HbS 镰刀形贫血突变的患者的杂交结果图。

本发明的目的是这样实现的。将设计的特异性探针固定于一种载体如载玻片、硅片、膜和高分子材料表面。用表面阵列的特异性 DNA 探针杂交方法来检测各种各种遗传病基因的突变。

探针设计:

选取遗传性贫血相关基因突变中中国人最常见的基因突变: β 地中海贫血症, 包括 $\beta 41-42(-TCTT)$, $IVS2-654(C-T)$, $\beta 17(A-T)$, $-28(A-G)$, $\beta 71-72(+A$ 或 $+T)$, $IVS1-5(G-C)$, $-30(T-C)$, $\beta 14-15(+G)$, $IVS1-1(G-C)$, $HbE26(G-A)$, $\beta 27-28(+C)$, $-29(A-G)$, $\beta 43(G-T)$, $IVS2-1(G-T)$, $\beta 1(T-G)$, $IVS(2-5)$, $\beta(30)$, -31 , -32 , $\beta(31)$, $cap+1$, $\beta(19)$, $\beta(95+A)$, $\beta(42+T)$, $\beta(1)$, $\beta(8)$, $\beta(8-9)$, $+40-43$, $\beta(37)$, $\beta(31)$ 突变; 血红蛋白异常的 Constant Spring(T-C), Quong SZE(T-C), $HbS(\beta 6 A-T)$, Duan($\alpha 75 A-C$), $HbM(\alpha 58 C-T, \alpha 87 C-T, \beta 68 T-A, \beta 93 C-T, \beta 64 C-T)$ 突变; 合成相对应得野生型和突变型 DNA 探针, 固定于芯片表面。相关探针如下:

β 地中海贫血症

$\beta(27-28) 1$ TGG TGA GGC CCT GGG CAG

$\beta(27-28) 2$ GGT GAG GCC CCT GGG CAG

β(43)1	GGT TCT TTG AGT CCT TT
β(43)2	GGT TCT TTT AGT CCT TT
β(42+T)2	AGG TTC TTT TGA GTC CT
IVS(2-1)1	CTT CAG GGT GAG TCT
IVS(2-1)2	CTT CAG GAT GAG TCT
β(1)1	ACA GAC ACC ATG GTG CAC CT
β(1)2	ACA GAC ACC AGG GTG CAC CT
β(8)1	GAG GAG AAG TCT GCC
β(8)2	TGA GGA GGT CTG CCG
β(8-9)2	AGG AGA AGG TCT GCC
β(37)1	TAC CCT TGG ACC CAG
β(37)2	TAC CCT TAG ACC CAG
P(+40-43)1	GCA ACC TCA AAC AGA CA
P(+40-43)2	AGC AAC CTC AGA CAC CA
P(β31, IVS1)1	CAC CCT TAG GCT GCT GG
P(IVS1)2	CCC ACC CTG AGG CTG CT
β(31)2	CCC TTA GGT GCT GGT GG
P(cap+1)1	ATT GCT TAC ATT TGC
P(cap+1)2	ATT GCT TCC ATT TGC
β(19)1	AAG GTG AAC GTG GAT
β(19)2	AAG GTG AGC GTG GAT
β(95+A)1	CTG TGA CAA GCT GCA
β(95+A)2	TGT GAC AAA GCT GCA
IVS(2-5)1	AGG GTG AGT CTA TGG
IVS(2-5)2	AGG GTG ACT CTA TGG
β(41-42)1	CAG AGG TTC TTT GAG T
β(41-42)2	CAG AGG TTG AGT CCT T
IVS(2-654)1	GTT AAG GCA ATA GCA
IVS(2-654)2	GTT AAG GTA ATA GCA
β(17)1	CTG TGG GGC AAG GTG AAC
β(17)2	CTG TGG GGC TAG GTG AAC
β(71-72)1	TGC CTT TAG TGA TGG

$\beta(71-72)2$	TGC CTT TAA GTG ATG
$\beta(71-72)3$	TGC CTT TTA GTG ATG
IVS(1-5)1	CAG GTT GGT ATC AAG
IVS(1-5)2	CAG GTT GCT ATC AAG
IVS(1-1)1	TGG GCA GGT TGG TAT
IVS(1-1)2	TGG GCA GTT TGG TAT
$\beta(30)2$	CTG GGC GGG TTG GTA
P(-28)1	GGG CAT AAG AGT CAG
P(-28)2	GGG CAT AGG AGT CAG
P(-29)2	TGG GCA TGG AAG TCA
P(-30)1	CTG GGC ATA AAA GTC
P(-30)2	CTG GGC ACA AAA GTC
P(-31)2	GCT GGG CGT AAA AGT
P(-32)2	GGC TGG GAA TAA AAG
$\beta(14-15)1$	TAC TGC CCT GTG GGG CAA GG
$\beta(14-15)2$	TAC TGC CCT GGT GGG GCA AG
HbE(26)1	TGG TGG TGA GGC CCT
HbE(26)2	TGG TGG TAA GGC CCT

α 地中海贫血症, HbH, HbS, 和 HbM 血红蛋白异常

Constant Spring 突变

P(cs)1 ATA CCG TTA AGC TGG

P(cs)2 ATA CCG TCA AGC TGG

Quong SZE 突变

P(qs)1 GCC TCC CTG GAC AAG

P(qs)2 GCC TCC CCG GAC AAG

HbS 镰刀形贫血突变

P(hbs)1 ACT CCT GAG GAG AAG

P(hbs)2 ACT CCT GTG GAG AAG

Duan 突变

P(duan)1 GTG GAC GAC ATG CCC

P(duan)2 GTG GAC GCC ATG CCC

HbM 突变

P(hbm) 1	TAA GGG CCA CGG CAA
P(hbm) 2	TAA GGG CTA CGG CAA
P(hbm) 3	CGA CCT GCA CGC GCA
P(hbm) 4	CGA CCT GTA CGC GCA
P(hbm) 5	AAG AAA GTG CTC GGT
P(hbm) 6	AAG AAA GAG CTC GGT
P(hbm) 7	TGA GCT GCA CTG TGA
P(hbm) 8	TGA GCT GTA CTG TGA
P(hbm) 9	GAA GGC TCA TGG CAA
P(hbm) 10	GAA GGC TTA TGG CAA

遗传性贫血诊断芯片的构建：合成以上 DNA 探针，5' 末端用氨基或其它活性基团修饰。每种探针重复 3 次固定于载体的活性表面，构建遗传性贫血诊断 DNA 专用芯片。

样品处理：用设计的 PCR 引物扩增待检测样品的靶的基因或突变区域，荧光标记可以用 PCR 引物 5' 末端标记或 PCR 扩增时加入荧光标记的 dNTP。

DNA 芯片表面杂交过程：荧光标记的 PCR 扩增产物在一定的条件下与遗传性贫血诊断芯片表面的 DNA 探针杂交，用特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。

杂交信号检测：杂交后用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号；从而可以检测待测基因突变。

图 1 为遗传性贫血诊断 DNA 专用芯片模式图。1：玻片；2：20 × 3 突变序列探针，从左到右是 IVS1-5(G-C)，IVS1-1(G-C)，HbE26(G-A)，β27-28(+C)，β17(A-T)，β14-15(+G)，-28(A-G)，-29(A-G)，-30(T-C)，-31，-32，β1(T-G)，cap+1，β(19)，β(8)，β(8-9)，+40-43，β(30)，β(31)，β(37)；3：20 × 3 与 2 相对应的正常序列探针；4：20 × 3 突变序列探针，从左到右是β71-72(+A 或+T)，β41-42(-TCTT)，β(42+T)，β43(G-T)，IVS2-654(C-T)，IVS2-1(G-T)，IVS(2-5)，β(95+A)；Constant Spring 突变，Quong SZE 突变，HbS 镰刀形贫血突变，Duan 突变，HbM 突变的 1，2，3，4，5，β41-42(-TCTT)，IVS2-654(C-T)。5：20 × 3 与 4 相对应的正常序列探针；

图 2 为检测β14-15(+G)，突变的地中海贫血患者的结果模式图。6：β14-15(+G) 突变位点信号。

图 3 为检测β14-15(+G)突变的地中海贫血患者的杂交结果图。7 和 8：正常

序列信号；6: β 14-15(+G)突变位点信号。

图 4 为检测 HbS 镰刀形贫血突变的患者的杂交结果图。7 和 8: 正常序列信号；9: HbS 镰刀形贫血突变位点信号。

实施例 1

利用本发明的芯片检测 β 14-15(+G)突变的地中海贫血患者。取待测者血液 1 毫升，利用商业化的基因组 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测者的基因组 DNA，用设计的 3 组 PCR（聚合酶链式反应）引物对 β 珠蛋白基因的外显子 1, 2, 3 进行扩增(一引物的 5'端用荧光修饰)。扩增的体积为 50 μ l，混合 PCR 产物，加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的-20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70%乙醇洗涤沉淀，干燥。

DNA 芯片表面杂交过程：

5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA，95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，冷却至室温，滴加于 DNA 阵列表面，再盖上载玻片，42 $^{\circ}$ C 杂交 4~8 小时。

杂交信号检测：

用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号。结果如图 3。

实施例 2

利用本发明的芯片检测 HbS 镰刀形贫血突变的贫血患者。取待测者血液 1 毫升，利用商业化的基因组 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测者的基因组 DNA，用设计的 3 组 PCR（聚合酶链式反应）引物对 β 珠蛋白基因的外显子 1, 2, 3 进行扩增(一引物的 5'端用荧光修饰)。扩增的体积为 50 μ l，混合 PCR 产物，加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的-20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70%乙醇洗涤沉淀，干燥。

DNA 芯片表面杂交过程：

5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA，95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，冷却至室温，滴加于 DNA 阵列表面，再盖上载玻片，42 $^{\circ}$ C 杂交 4~8 小时。

杂交信号检测：

用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号。结果如图 4。
实施例说明本发明在遗传性贫血相关基因突变检测方面的应用的可行性。适合于早期诊断，产前筛查遗传性贫血。

说明书

检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片

本发明涉及一种检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片。

中国是一个遗传病大国。遗传病是由于人体生殖细胞或受精卵的遗传物质发生改变而引起的疾病，从亲代传至后代。通常包括三大类：单基因遗传病，染色体遗传病和多基因遗传病。从世界范围讲，新生儿中至少 2% 有明显的先天异常。虽然大多数遗传病的发病率低（多基因病除外）。然而遗传病种类繁多，因此总数很多。仅单基因遗传病就有 4000 多种，染色体病有 100 多种，多基因病也不少于 100 种。并且目前国际上以平均每年发现 100 多种新单基因遗传病的速度在发展。这也反应了遗传病带给医学，社会和家庭问题的严重性。

绝大多数遗传病目前还没有有效的治疗方法，因此预防就显得尤为重要。若能在妊娠早期诊断出胎儿是否患病，对患病胎儿进行人工流产，可防止患儿出生。产前遗传筛检，辅以人工流产，已证明是一种有效预防严重危害健康的遗传病的方法。我国现有残疾人 5000 万，其中相当数量是遗传病引起的。由于边远地区和某些农村近亲结婚率高，遗传病发病率仍呈现上升趋势，因此广泛开展产前遗传筛检，杜绝患儿出生，降低发病率，对于我国优生优育，提高人口素质起着重要作用。

由于许多遗传病特别是单基因孟德尔型遗传病的基因及基因突变的机制已研究清楚，使我们在基因水平能准确诊断大部分遗传病。在许多发达国家，新生婴儿的遗传筛检很普遍。例如早在 60 年代，美国法律已规定必须对所有新生婴儿进行苯丙酮酸尿症的筛检。彻底消除了因苯丙酮酸尿症引起的智能障碍儿童的出现。因为如果苯丙酮酸尿症婴儿在出生时便能及时接受特别食谱治疗，就不会出现疾病症状。另外针对特定的新生儿遗传筛检，如针对黑人婴儿的镰刀血球细胞症，犹太婴儿的戴萨克斯症等都已普遍实施。但在中国，由于遗传病种类繁多，传统遗传筛检方法需要较昂贵的仪器，专业人才，高费用等，使我国在产前产后遗传筛检普及方面做得非常不够。这对中国的可持续发展问题，人口素质提高问题，社会保障负担问题都有非常深远的影响。

在产前遗传筛检和人工流产结合，控制遗传病发病率最成功的事例是地中海地区对 β 地中海贫血症的控制。地中海贫血是一种遗传性溶血性贫血，是世界上最常见和发病率最高的一种单基因遗传病。在地中海地区，美国黑人，东南亚，印度次大陆和中国南方（广东，广西，海南，贵州，四川等省）发病率较

高。从 1975 年以来,地中海地区的塞浦路斯,意大利, Sardinia, 和希腊成功地实施了产前遗传筛检和选择性人工流产方法,现在地中海贫血的发病率显著下降了 5 倍以上。

因为遗传病种类多,每种遗传病所相关基因突变也多。传统的遗传病诊断方法费时费力,且价格昂贵,不适合在中国进行全国性的产前遗传筛检。在现有技术中,6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症等遗传性贫血的诊断主要是利用相关基因突变检测和酶活性分析方法。疾病相关基因突变的检测主要有(1) PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism),该方法利用多种限制性内切酶对基因扩增产物进行酶切,不同的基因序列将产生不同的电泳图谱(Mercier, B. et al., Eur. J. Immunogenetics, 21, 105, 1994)。该方法只能应用于当突变改变了某一酶切位点时。该方法的改进是在突变位点引入酶切位点法,即 PCR-AIRS(attificial introduction of restriction sites)(Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993)。(2) PCR-SSO(sequence specific oligonucleotide) 或 PCR-ASO(allele specific oligonucleotide)(Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993; Saiki, R. K. et al., Nature, 324, 163, 1986),待测基因经 PCR 扩增后,分别与 15-20bp 标记的野生型和突变型探针杂交。该方法需进行同位素标记或地高辛,生物素,过氧化物酶等标记,分析过程复杂,不适宜快速分析。(3) PCR-SSP(sequence specific primers)或 ASPCR(allele specific PCR),其原理是根据已知突变位点的性质在引物中设计一错配碱基,使之仅能扩增突变型或野生型基因。该方法较为快速简便。(Wu, D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2757, 1989; Rust, S., et al., Nucleic Acids Research, 21, 3623, 1993; Newton, R. et al., Nucleic Acids Research, 17, 2503, 1989)。(4) PCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism),SSCP 是指单链 DNA 分子在中性 PAGE 中电泳迁移率随其构象改变的性质。因此可作为基因变异的检测方法,最早由 Orita 用于癌基因点突变和人基因组多态性研究(Orita, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766, 1989),此法仅能检测基因变异的存在,而不能确定突变的部位和内容。(5) DNA 测序法,这是最直观,最准确的方法。但技术复杂价格昂贵,不能作为常规方法。

综上所述,在有关 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症相关基因突变诊断的现有技术中,存在操作繁杂,所需时间长,成本较高,难以自动化及大量样本平行分析等问题。

本发明的目的是提供一种能同时检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症所有相关基因突变的检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片。

为了达到上述目的本发明采取下列措施：

检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片是利用微机械阵列点样仪将检测各种疾病相关基因突变的 DNA 探针固定于玻片、硅片、膜、高分子材料载体上，所说的探针为：

95(1)	GAT ACA CAC ATA TTC
95(2)	GAT ACA CGC ATA TTC
371(1)	AAC AGC CAC ATG GAT
371(2)	AAC AGC CGC ATG GAT
392(1)	CAC CTG GGG TCA CAG
392(2)	CAC CTG GTG TCA CAG
487(1)	CAG CAG AGG CTG GAA
487(2)	CAG CAG AAG CTG GAA
493(1)	AGG CTG GAA CCG CAT
493(2)	AGG CTG GGA CCG CAT
517(1)	GAA GCC CTT CGG GAG
517(2)	GAA GCC CCT CGG GAG
519(2)	GAA GCC CTT GGG GAG
592(1)	GAT CTA CCG CAT CGA
592(2)	GAT CTA CTG CAT CGA
835(1)	CGC CTC CAC CAA CTC
835(2)	CGC CTC CTC CAA CTC
1024(1)	CGT CGT CCT CTA TGT
1024(2)	CGT CGT CTT CTA TGT
1311(1)	ACG CCT ACG AGC GCC
1311(2)	ACG CCT ATG AGC GCC
1360(1)	CTT CGT GCG CAG GTG
1360(2)	CTT CGT GTG CAG GTG
1376(1)	GAG CTC CGT GAG GC
1376(2)	GAG CTC CTT GAG GC
1388(1)	GCC TGG CGT ATT TTC

1388(2)

GCC TGG CAT ATT TTC

本发明与现有技术相比，在一显微镜载玻片或其它载体表面，不同的 5' 末端氨基修饰 DNA 探针固定于活性载体表面，因此可同时检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症所有相关基因突变。具有平行分析和多重分析的特定。分辨率和灵敏度高，适合于早期诊断单基因遗传性疾病。本发明利用 5' 末端荧光标记 PCR 引物，由此标记的 PCR 产物可应用于生物芯片杂交。同一芯片可同时检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因的外显子 2 的 95 (A-G)，外显子 5 的 371 (A-G)，392 (G-T)，外显子 6 的 487 (G-A)，493 (A-G)，517 (T-C)，519 (C-G)，592 (G-T)，外显子 8 的 835 (A-T)，外显子 9 的 1024 (C-T)，外显子 11 的 1311 (C-T)，1360 (C-T)，和外显子 12 的 1376 (G-T)，1388 (G-A) 突变。本发明也适用于其他已知基因突变的遗传病和其他疾病的检测及单核苷酸多态性 (SNP) 的检测。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

图 1 是 DNA 芯片模式图；

图 2 是检测 1360 (C-T) 突变的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症患者的模拟结果图；

图 3 是检测 1360 (C-T) 突变的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症患者的杂交结果图。

本发明利用 DNA 芯片技术检测引起 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症的相关基因突变。开发中国常见遗传病诊断基因芯片将是最好的产前遗传筛检方法。我们已经完成了地中海贫血，血红蛋白异常和苯丙酮酸尿症等遗传病诊断基因芯片。本发明是中国常见遗传病诊断基因芯片系列的一种。如果全国广泛采用我们的中国常见遗传病诊断系列基因芯片进行全面的产前遗传筛检，结合选择性的人工流产，从而彻底杜绝严重影响身体发育，智力发育的遗传病的出现，对提高我国人口素质，减轻社会家庭的负担具有重要的意义。

本发明设计的 DNA 特异性探针，利用微机械阵列点样仪将设计的 DNA 探针固定于载体表面 (载玻片，硅片，高分子材料，膜)；用表面阵列的特异性 DNA 探针杂交方法来检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症遗传病基因的突变。

探针设计：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因的外显子 2 的 95 (A-G)，外显子 5 的 371 (A-G)，392 (G-T)，外显子 6 的 487 (G-A)，493 (A-G)，517 (T-C)，519 (C-G)，592 (C-T)，外显子 8 的 835 (A-T)，外显子 9 的 1024 (C-T)，外显子 11 的 1311 (C-T)，1360 (C-T)，和外显子 12 的 1376 (G-T)，1388 (G-A) 突变，设计相对应得野生型

和突变型 DNA 探针，固定于芯片表面。相关探针如下：

6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变探针

95(1)	GAT ACA CAC ATA TTC
95(2)	GAT ACA CGC ATA TTC
371(1)	AAC AGC CAC ATG GAT
371(2)	AAC AGC CGC ATG GAT
392(1)	CAC CTG GGG TCA CAG
392(2)	CAC CTG GTG TCA CAG
487(1)	CAG CAG AGG CTG GAA
487(2)	CAG CAG AAG CTG GAA
493(1)	AGG CTG GAA CCG CAT
493(2)	AGG CTG GGA CCG CAT
517(1)	GAA GCC CTT CGG GAG
517(2)	GAA GCC CCT CGG GAG
519(2)	GAA GCC CTT GGG GAG
592(1)	GAT CTA CCG CAT CGA
592(2)	GAT CTA CTG CAT CGA
835(1)	CGC CTC CAC CAA CTC
835(2)	CGC CTC CTC CAA CTC
1024(1)	CGT CGT CCT CTA TGT
1024(2)	CGT CGT CTT CTA TGT
1311(1)	ACG CCT ACG AGC GCC
1311(2)	ACG CCT ATG AGC GCC
1360(1)	CTT CGT GCG CAG GTG
1360(2)	CTT CGT GTG CAG GTG
1376(1)	GAG CTC CGT GAG GC
1376(2)	GAG CTC CTT GAG GC
1388(1)	GCC TGG CGT ATT TTC
1388(2)	GCC TGG CAT ATT TTC

DNA 探针的固定：

利用化学或物理方法将设计的 DNA 探针，以每种探针重复 4 次固定于载体表面(载玻片，硅片，高分子材料，膜)。构建 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症遗

传病诊断 DNA 专用芯片。

样品处理：

取待测者血液 1 毫升，利用商业化的基因组 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测者的基因组 DNA，用设计的 6 组 PCR（聚合酶链式反应）引物对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因的外显子 2, 5, 6, 8, 9, 11 和 12 进行扩增。

设计的 PCR 引物如下表：

Exon 2	5'-tgccttggttaacgagccttt-3'	FITC-5'-caggcacttcctggctttta-3'
Exon 5	5'-accccgagaggagaagctca-3'	FITC-5'-cgtgaatgttcttggtgacg-3'
Exon 6	5'-tctgaatgatgcagctgtga -3'	FITC-5'-acctcagcaccatgaggttc-3'
Exon 8	5'-actgcagatgctgtgtctgg-3'	FITC-5'-tcagtgcctcgtcacagatg-3'
Exon 9	5'-ccaactcaacacccaaggag-3'	FITC-5'-cgaaggcatcacctaccatc-3'
Exon 11, 12	5'-cagtggcatcagcaagacac-3'	FITC-5'-aatataggggatgggcttgg-3'

扩增的体积为 50 μ l, 0.5 μ g 基因组 DNA, 200 μ M 的 dNTPs, 0.5 μ M 的 PCR 引物和 0.5 μ M 的荧光修饰引物。5 μ l 的 10 \times 缓冲液, 5 U 的 DNA 聚合酶。混合以上 PCR 产物, 加入 1/10 体积的 3 M pH5.2 醋酸缓冲液, 加入 2.5 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇, 混匀后, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 用 70%乙醇洗涤沉淀, 干燥。

DNA 芯片表面杂交过程：

5 μ l 杂交缓冲液 (5 X SSC, 0.2% SDS) 溶解上述 DNA, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 冷却至室温, 滴加于 DNA 阵列表面, 再盖上载玻片, 42 $^{\circ}$ C 杂交 4~8 小时。用特定的洗脱条件, 洗脱芯片。

杂交信号检测：

用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号。

图 1 为 DNA 芯片模式图。1: 载玻片; 2: 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因 14 突变位点的突变探针 (14 probes \times 5) 阵列, 从左到右分别对应于 95(A-G), 371(A-G), 392(G-T), 487(G-A), 493(A-G), 517(T-C), 519(C-G), 592(C-T), 835(A-T), 1024(C-T), 1311(C-T), 1360(C-T), 1376(G-T), 1388(G-A) 突变;

3: 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因 14 突变位点的正常探针 (14 probes x 5) 阵列, 从左到右分别对应于 95(A-G), 371(A-G), 392(G-T), 487(G-A), 493(A-G), 517(T-C), 519(C-G), 592(C-T), 835(A-T), 1024(C-T), 1311(C-T), 1360(C-T), 1376(G-T), 1388(G-A) 位点。

图 2 检测 1360(C-T) 突变的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症患者的模拟结果。

1: 玻片; 4: 1360(C-T) 突变信号; 5: 1360 正常位点探针;

图 3 1360(C-T) 突变的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症患者的杂交结果。

实施例

利用本发明的芯片检测 1360(C-T) 突变的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症患者。取待测者血液 1 毫升, 利用商业化的基因组 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测者的基因组 DNA。用设计的六组 PCR (聚合酶链式反应) 引物对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因的外显子 2, 5, 6, 8, 9, 11 和 12 扩增, 混合以上 PCR 产物, 加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液, 加入 2.5 倍体积的 -20 °C 冷藏的 100% 乙醇, 混匀后, -20 °C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥。5 μ l 杂交缓冲液 (5 X SSC, 0.2% SDS) 溶解上述 DNA, 95 °C 变性 5 分钟, 冷却至室温, 滴加于 DNA 阵列表面, 再盖上载玻片, 42 °C 杂交 4~8 小时。用荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号, 结果如图 3。

说明书

苯丙氨酸羟化酶基因突变诊断专用 DNA 芯片

本发明涉及一种苯丙氨酸羟化酶基因突变诊断专用 DNA 芯片。

中国是一个遗传病大国。遗传病是由于人体生殖细胞或受精卵的遗传物质发生改变而引起的疾病，从亲代传至后代。通常包括三大类：单基因遗传病，染色体遗传病和多基因遗传病。从世界范围讲，新生儿中至少 2% 有明显的先天异常。虽然大多数遗传病的发病率低（多基因病除外）。然而遗传病种类繁多，因此总数很多。仅单基因遗传病就有 4000 多种，染色体病有 100 多种，多基因病也不少于 100 种。并且目前国际上以平均每年发现 100 多种新单基因遗传病的速度在发展。这也反应了遗传病带给医学，社会和家庭问题的严重性。

绝大多数遗传病目前还没有有效的治疗方法，因此预防就显得尤为重要。若能在妊娠早期诊断出胎儿是否患病，对患病胎儿进行人工流产，可防止患儿出生。产前遗传筛检，辅以人工流产，已证明是一种有效预防严重危害健康的遗传病的方法。我国现有残疾人 5000 万，其中相当数量是遗传病引起的。由于边远地区和某些农村近亲结婚率高，遗传病发病率仍呈现上升趋势，因此广泛开展产前遗传筛检，杜绝患儿出生，降低发病率，对于我国优生优育，提高人口素质起着重要作用。

由于许多遗传病特别是单基因孟德尔型遗传病的基因及基因突变的机制已研究清楚，使我们在基因水平能准确诊断大部分遗传病。在许多发达国家，新生婴儿的遗传筛检很普遍。例如早在 60 年代，美国法律已规定必须对所有新生婴儿进行苯丙酮酸尿症的筛检。彻底消除了因苯丙酮酸尿症引起的智能障碍儿童的出现。因为如果苯丙酮酸尿症婴儿在出生时便能及时接受特别食谱治疗，就不会出现疾病症状。另外针对特定的新生儿遗传筛检，如针对黑人婴儿的镰刀血球细胞症，犹太婴儿的戴萨克斯症等都已普遍实施。但在中国，由于遗传病种类繁多，传统遗传筛检方法需要较昂贵的仪器，专业人才，高费用等，使我国在产前产后遗传筛检普及方面做得非常不够。希望中国有关方面重视该问题。这对中国的可持续发展问题，人口素质提高问题，社会保障负担问题都有非常深远的影响。举例来说，苯丙酮酸尿症是由于肝脏苯丙氨酸羟化酶（PAN）严重缺乏所致的常染色体隐性遗传病。患者由于苯丙氨酸羟化酶缺乏或不足，造成苯丙氨酸不能按其正常代谢途径转化为酪氨酸，使得苯丙氨酸代谢物在体内大量蓄积，损坏患者的神经系统发育，而导致智力发育障碍。在欧美地区发

病率为 1/10000, 在我国是 1/16000。

苯丙酮酸尿症婴儿出生时, 应立即停止母乳喂养, 采用低苯丙氨酸饮食疗法 8-10 年, 才能维持患者智力发育正常, 费用昂贵, 在我国难以实行。因此实行产前诊断, 并辅以人工流产是杜绝患者出生的最有效途径。由于苯丙氨酸羟化酶基因只在肝细胞中特异表达, 不能用血细胞, 羊水, 绒毛细胞进行酶活性检测, 因而只能进行基因突变分析。

我国尚未全面普及苯丙酮酸尿症产前筛检, 以发病率 1/16000 计, 仅此一种遗传病, 就使我国有近 10 万的智能障碍者, 给社会造成巨大负担。

苯丙氨酸羟化酶 (PAN) 基因位于 12 号染色体长臂, 即 $12q^{22} - 12q^{24.1}$, 全长约 90kb, 包括 13 个外显子, 每个外显子长度在 57-892 bp 之间, 全长 2.3 kb, 其阅读框架为 1353 bp, 编码 451 个氨基酸的多肽链。

疾病相关基因突变的检测主要有 (1) PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), 该方法利用多种限制性内切酶对基因扩增产物进行酶切, 不同的基因序列将产生不同的电泳图谱 (Mercier, B. et al., Eur. J. Immunogenetics, 21, 105, 1994)。该方法只能应用于当突变改变了某一酶切位点时。该方法的改进是在突变位点引入酶切位点法, 即 PCR-AIRS (artificial introduction of restriction sites) (Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993)。(2) PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) 或 PCR-ASO (allele specific oligonucleotide) (Cotton, R. G. H. Mut. Res., 285, 125, 1993; Saiki, R. K. et al., Nature, 324, 163, 1986), 待测基因经 PCR 扩增后, 分别与 15-20bp 标记的野生型和突变型探针杂交。该方法需进行同位素标记或地高辛, 生物素, 过氧化物酶等标记, 分析过程复杂, 不适宜快速分析。(3) PCR-SSP (sequence specific primers) 或 ASPCR (allele specific PCR), 其原理是根据已知突变位点的性质在引物中设计一错配碱基, 使之仅能扩增突变型或野生型基因。该方法较为快速简便。(Wu, D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2757, 1989; Rust, S., et al., Nucleic Acids Research, 21, 3623, 1993; Newton, R. et al., Nucleic Acids Research, 17, 2503, 1989)。(4) PCR-SSCP (single-stranded conformation polymorphism), SSCP 是指单链 DNA 分子在中性 PAGE 中电泳迁移率随其构象改变的性质。因此可作为基因变异的检测方法, 最早由 Orita 用于癌基因点突变和人基因组多态性研究 (Orita, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2766, 1989), 此法仅能检测基因变异的存在, 而不能确定突变的部位和内容。

(5) DNA 测序法是最直观准确的方法。但技术复杂价格昂贵, 不能作为常规方法。

综上所述, 在有关疾病相关基因突变诊断的现有技术中, 存在操作繁杂, 所需时间长, 成本较高, 难以自动化及大量样本平行分析等问题。因为 PKU 病症可以利用低苯丙氨酸饮食进行治疗。所以 PKU 的早期诊断非常重要。在美国, 英国等发达国家, 出生婴儿都要进行 PKU 诊断筛选。现有的 PKU 基因诊断筛选主要是利用 RFLP 方法检测苯丙氨酸羟化酶基因的突变, 由于苯丙氨酸羟化酶基因的相关突变非常多, RFLP 方法难以应付。

本发明的目的是提供一种可同时检测苯丙氨酸羟化酶所有基因突变位点的苯丙氨酸羟化酶基因突变诊断专用 DNA 芯片。

为了达到上述目的本发明采取下列措施:

苯丙氨酸羟化酶基因突变诊断专用 DNA 芯片是在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测苯丙氨酸羟化酶基因突变的特异 DNA 探针, 形成中密度 DNA 探针阵列, 所说探针为:

Gly46Ser	wild	AATGCACCAACTTC
	Mut	AATGCACTAACTTC
Leu48Ser	wild	TTTGGCCAATGCACC
	Mut	TTTGGCCGATGCACC
Glu56Asp	wild	TATTTGAGGTCAGTA
	Mut	TATTTGATGTCAGTA
Leu98Ser	wild	ATGCCTCAAGATCTT
	Mut	ATGCCTCGAGATCTT
Arg111Term	wild	TTATCTCGTGAAAGC
	Mut	TTATCTCATGAAAGC
Arg158Gln	wild	CTGCTTCCGTCTTGCA
	Mut	CTGCTTCTGTCTTGCA
Arg158Trp	wild	TGCTTCCGTCTTGCA
	Mut	TGCTTCCATCTTGCA
Phe161Ser	wild	AAGCAGTTTGCTGAC
	Mut	AAGCAGTCTGCTGAC
Tyr204Term	wild	TGTACTCATAGCAAG
	Mut	TGTACTCCTAGCAAG
Arg241His	wild	GGTTTCCGCCTCCGA

	Mut	GGTTTCCACCTCCGA
Arg243Gln	wild	CACAGGTGCGAGGCG
	Mut	CACAGGTTGGAGGCG
Pro244Leu	wild	AGCCACAGGTCGGAG
	Mut	AGCCACAAGTCGGAG
Gly247Val	wild	GTGGCTGGCCTGCTT
	Mut	GTGGCTGTCCTGCTT
Leu249His	wild	GGCCTGCTTTCCTCT
	Mut	GGCCTGCATTCCTCT
Arg252Gln	wild	GAAATCCCGAGAGGA
	Mut	GAAATCCTGAGAGGA
Phe254Ile	wild	TCGGGATTTCTTGGG
	Mut	TCGGGATATCTTGGG
Leu255Val	wild	GGATTTCTTGGGTGG
	Mut	GGATTTCGTGGGTGG
Gly257Val	wild	TTGGGTGGCCTGGCC
	Mut	TTGGGTGTCCTGGCC
Ala259Val	wild	TCGGAAGGCCAGGCC
	Mut	TCGGAAGACCAGGCC
Arg261Gln	wild	GAAGACTCGGAAGGC
	Mut	GAAGACTTGGAAGGC
Arg261Pro	mut	GAAGACTGGGAAGGC
Ser273Phe	wild	GGGCTTGGATCCATG
	Mut	GGGCTTGAATCCATG
Tyr277Asp	wild	GGGTATACATGGGC
	Mut	GGGTATCCATGGGC
Gly280Lys	wild	TCAGGTTCGGGGTA
	Mut	TCAGGTTTGGGGTA
Phe299Cys	wild	CTGGGCAAAGCTGCG
	Mut	CTGGGCACAGCTGCG
Leu311Pro	wild	TGCACCCAGAGAGGC
	Mut	TGCACCCGGAGAGGC

Trp326Term	wild	AGTAAACCAGTAAAT
	Mut	AGTAAACTAGTAAAT
Ala345Thr	wild	ATATGGTGCTGGGCT
	Mut	ATATGGTACTGGGCT
Ser349Leu	wild	AAAGGATGACAGGAG
	Mut	AAAGGATAACAGGAG
Ser349Pro	wild	AAGGATGACAGGAGC
	Mut	AAGGATGGCAGGAGC
Tyr356Term	wild	ATAAGCAGTACTGTA
	Mut	ATAAGCATTACTGTA
	Mut	ATAAGCACTACTGTA
Ser359Term	wild	CTTCTCTGATAAGCA
	Mut	CTTCTCTCATAAGCA
Val388Met	wild	TCTGCCACGTAATAC
	Mut	TCTGCCATGTAATAC
Val388Leu	Mut	TCTGCCAGGTAATAC
Pro407Ser	wild	GGCCGAGGTATTGTG
	Mut	GGCCGAGATATTGTG
Arg408Gln	wild	GAAGGGCCGAGGTAT
	Mut	GAAGGGCTGAGGTAT
Arg413Ser	wild	TCGTAGCGAAGTGAG
	Mut	TCGTAGCTAACTGAG
Thr418Pro	wild	CCCATACACCCAAAG
	Mut	CCCATACCCCCAAAG
IVs4nt-1	wild	TCTCCTAGGGTTTTA
	Mut	TCTCCTAAGGTTTTA
IVs7nt+2	wild	CGAACCGTGAGTACT
	Mut	CGAACCGAGAGTACT

本发明与现有技术相比，在一显微镜载玻片大小的载体表面，固定 79×4 DNA 探针，因此可同时检测苯丙氨酸羟化酶所有基因突变位点 Gly46Ser、Leu48Ser、Glu56Asp、Leu98Ser、Arg111Term、Arg158Gln、Arg158Trp、Phe161Ser、Tyr204Term、Arg241His、Arg243Gln、Pro244Leu、Gly247Val、

Leu249His、Arg252Gln、Phe254Ile、Leu255Val、Gly257Val、Ala259Val、Arg261Gln、Arg261Pro、Ser273Phe、Tyr277Asp、Gly280Lys、Phe299Cys、Leu311Pro、**Trp326Term**、Ser349Leu、Ser349Pro、**Tyr356Term**、Ser359Term、Val388Met、Ala345Thr、Val388Leu、Pro407Ser、Arg408Gln、Arg413Ser、Thr418Pro、IVs4nt-1 (G-A)、IVs-7nt2 (T-A)。具有平行分析和多重分析特点。特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。生产成本少于 20 元。适合于早期诊断，产前筛查苯丙酮酸尿症。本发明也适用于其他已知基因突变的遗传病和其他疾病的检测及单核苷酸多态性 (SNP) 的检测。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

图 1 是苯丙酮酸尿症诊断 DNA 专用芯片模式图；

图 2 是检测 Arg243Gln 突变的苯丙酮酸尿症患者的结果模式图；

图 3 是检测 Arg243Gln 突变的苯丙酮酸尿症患者的杂交结果图。

本发明利用生物芯片技术在一种载体如载玻片、硅片、膜和高分子材料上固定我们设计的可检测苯丙氨酸羟化酶基因突变的特异 DNA 探针，形成中密度 (> 2000/microscope slide) 的 DNA 探针阵列。用载体表面的特异性 DNA 探针杂交方法来检测苯丙氨酸羟化酶基因中国人种常见突变。

苯丙氨酸羟化酶基因中国人种常见突变位点的检索：我们检索了大量文献资料，导致中国人苯丙酮酸尿症的苯丙氨酸羟化酶基因突变位点有 40 种。分别是 Gly46Ser、Leu48Ser、Glu56Asp、Leu98Ser、Arg111Term、Arg158Gln、Arg158Trp、Phe161Ser、Tyr204Term、Arg241His、Arg243Gln、Pro244Leu、Gly247Val、Leu249His、Arg252Gln、Phe254Ile、Leu255Val、Gly257Val、Ala259Val、Arg261Gln、Arg261Pro、Ser273Phe、Tyr277Asp、Gly280Lys、Phe299Cys、Leu311Pro、**Trp326Term**、Ala345Thr、Ser349Leu、Ser349Pro、**Tyr356Term**、Ser359Term、Val388Met、Val388Leu、Pro407Ser、Arg408Gln、Arg413Ser、Thr418Pro、IVs4nt-1 (G-A)、IVs-7nt2 (T-A)。

DNA 探针设计：选取与 PKU 相关的 40 种苯丙氨酸羟化酶基因突变，合成相对应的野生型和突变型 DNA 探针，固定于载体表面。设计的相关探针如下：

Gly46Ser wild AATGCACCAACTTC

 Mut AATGCACTAACTTC

Leu48Ser wild TTTGGCCAATGCACC

 Mut TTTGGCCGATGCACC

Glu56Asp wild TATTTGAGGTCAGTA

	Mut	TATTTGATGTCAGTA
Leu98Ser	wild	ATGCCTCAAGATCTT
	Mut	ATGCCTCGAGATCTT
Arg111Term	wild	TTATCTCGTGAAAGC
	Mut	TTATCTCATGAAAGC
Arg158Gln	wild	CTGCTTCCGTCTTG
	Mut	CTGCTTCTGTCTTG
Arg158Trp	wild	TGCTTCCGTCTTGCA
	Mut	TGCTTCCATCTTGCA
Phe161Ser	wild	AAGCAGTTTGCTGAC
	Mut	AAGCAGTCTGCTGAC
Tyr204Term	wild	TGTACTCATAGCAAG
	Mut	TGTACTCCTAGCAAG
Arg241His	wild	GGTTTCCGCCTCCGA
	Mut	GGTTTCCACCTCCGA
Arg243Gln	wild	CACAGGTGCGAGGCG
	Mut	CACAGGTTGGAGGCG
Pro244Leu	wild	AGCCACAGGTCGGAG
	Mut	AGCCACAAGTCGGAG
Gly247Val	wild	GTGGCTGGCCTGCTT
	Mut	GTGGCTGTCCTGCTT
Leu249His	wild	GGCCTGCTTTCCTCT
	Mut	GGCCTGCATTCCTCT
Arg252Gln	wild	GAAATCCCGAGAGGA
	Mut	GAAATCCTGAGAGGA
Phe254Ile	wild	TCGGGATTTCTTGGG
	Mut	TCGGGATATCTTGGG
Leu255Val	wild	GGATTTCTTGGGTGG
	Mut	GGATTTTCGTGGGTGG
Gly257Val	wild	TTGGGTGGCCTGGCC
	Mut	TTGGGTGTCCTGGCC
Ala259Val	wild	TCGGAAGGCCAGGCC

	Mut	TCGGAAGACCAGGCC
Arg261Gln	wild	GAAGACTCGGAAGGC
	Mut	GAAGACTTGAAGGC
Arg261Pro	mut	GAAGACTGGGAAGGC
Ser273Phe	wild	GGGCTTGGATCCATG
	Mut	GGGCTTGAATCCATG
Tyr277Asp	wild	GGGGTATACATGGGC
	Mut	GGGGTATCCATGGGC
Gly280Lys	wild	TCAGGTTCGGGGGTA
	Mut	TCAGGTTTGGGGGTA
Phe299Cys	wild	CTGGGCAAAGCTGCG
	Mut	CTGGGCACAGCTGCG
Leu311Pro	wild	TGCACCCAGAGAGGC
	Mut	TGCACCCGGAGAGGC
Trp326Term	wild	AGTAAACCAGTAAAT
	Mut	AGTAACTAGTAAAT
Ala345Thr	wild	ATATGGTGCTGGGCT
	Mut	ATATGGTACTGGGCT
Ser349Leu	wild	AAAGGATGACAGGAG
	Mut	AAAGGATAACAGGAG
Ser349Pro	wild	AAGGATGACAGGAGC
	Mut	AAGGATGGCAGGAGC
Tyr356Term	wild	ATAAGCAGTACTGTA
	Mut	ATAAGCATTACTGTA
	Mut	ATAAGCACTACTGTA
Ser359Term	wild	CTTCTCTGATAAGCA
	Mut	CTTCTCTCATAAGCA
Val388Met	wild	TCTGCCACGTAATAC
	Mut	TCTGCCATGTAATAC
Val388Leu	Mut	TCTGCCAGGTAATAC
Pro407Ser	wild	GGCCGAGGTATTGTG
	Mut	GGCCGAGATATTGT

Arg408Gln	wild	GAAGGGCCGAGGTAT
	Mut	GAAGGGCTGAGGTAT
Arg413Ser	wild	TCGTAGCGAAGTGAG
	Mut	TCGTAGCTAACTGAG
Thr418Pro	wild	CCCATACACCCAAAG
	Mut	CCCATACCCCAAAG
IVs4nt-1	wild	TCTCCTAGGGTTTTA
	Mut	TCTCCTAAGGTTTTA
IVs7nt+2	wild	CGAACCGTGAGTACT
	Mut	CGAACCGAGAGTACT

PKU 诊断芯片的构建：合成以上 79 种 DNA 探针，5' 末端用氨基或其它活性基团修饰。每种探针重复 4 次固定于载体的活性表面，构建 PKU 诊断 DNA 专用芯片。

样品处理：用设计的 PCR 引物扩增待检测样品的靶的基因或突变区域，荧光标记可以用 PCR 引物 5' 末端标记或 PCR 扩增时加入荧光标记的 dNTP。

DNA 芯片表面杂交过程：荧光标记的 PCR 扩增产物在一定的条件下与 PKU 诊断芯片表面的 DNA 探针杂交，用特定的洗脱条件可以区分全配杂交和单碱基失配杂交。

杂交信号检测：杂交后用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号；从而可以检测苯丙氨酸羟化酶基因突变。

图 1 为苯丙酮酸尿症诊断 DNA 专用芯片模式图。1：玻片；2：20 × 4 突变序列探针，从左到右是 Gly46Ser、Leu48Ser、Glu56Asp、Leu98Ser、Arg111Term、Arg158Gln、Arg158Trp、Phe161Ser、Tyr204Term、Arg241His、Arg243Gln、Pro244Leu、Gly247Val、Leu249His、Arg252Gln、Phe254Ile、Leu255Val、Gly257Val、Ala259Val、Arg261Gln；3：20 × 4 与 2 相对应的正常序列探针；4：20 × 4 突变序列探针，从左到右是 Arg261Pro、Ser273Phe、Tyr277Asp、Gly280Lys、Phe299Cys、Leu311Pro、Trp326Term、Ala345Thr、Ser349Leu、Ser349Pro、Tyr356Term、Ser359Term、Val388Met、Val388Leu、Pro407Ser、Arg408Gln、Arg413Ser、Thr418Pro、IVs4nt-1 (G-A)、IVs-7nt2 (T-A)；5：20 × 4 与 4 相对应的正常序列探针；

图 2 为检测 Arg243Gln 突变的苯丙酮酸尿症患者的结果模式图。6：Arg243Gln 突变位点信号。

图 3 为检测 Arg243Gln 突变的苯丙酮酸尿症患者的杂交结果图。7 和 8: 正常序列信号; 9: Arg243Gln 突变位点信号。

实施例

利用本发明的芯片检测 Arg243Gln 突变的苯丙酮酸尿症患者。取待测者血液 1 毫升, 利用商业化的基因组 DNA 抽提试剂盒或标准的苯酚抽提/乙醇沉淀方法提取待测者的基因组 DNA, 用设计的 11 组 PCR (聚合酶链式反应) 引物对苯丙氨酸羟化酶基因的外显子 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 进行扩增。扩增的体积为 50 μ l, 混合 PCR 产物, 加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液, 加入 2.5 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 冷藏的 100%乙醇, 混匀后, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 用 70%乙醇洗涤沉淀, 干燥。

DNA 芯片表面杂交过程:

5 μ l 杂交缓冲液 (5 X SSC, 0.2% SDS) 溶解上述 DNA, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 冷却至室温, 滴加于 DNA 阵列表面, 再盖上载玻片, 42 $^{\circ}$ C 杂交 4~8 小时。

杂交信号检测:

用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号。结果如图 3。实施例说明本发明在疾病苯丙酮酸尿症相关基因突变检测方面的应用。苯丙酮酸尿症 (PKU) 是一种单基因突变引起的智力迟缓的遗传性疾病。是由于苯丙氨酸羟化酶基因活性缺失, 苯丙氨酸羟化酶催化苯丙氨酸降解反应的第一步即苯丙氨酸转化为酪氨酸。所以缺失苯丙氨酸羟化酶, 苯丙氨酸在血液中积累并转化为苯丙酮酸, 损坏神经系统的发育。因为 PKU 病症可以利用低苯丙氨酸饮食进行治疗。所以 PKU 的早期诊断非常重要。在美国, 英国等发达国家, 出生婴儿都要进行 PKU 诊断筛选。现有的 PKU 基因诊断筛选主要是利用 RFLP 方法检测苯丙氨酸羟化酶基因的突变, 由于苯丙氨酸羟化酶基因的相关突变非常多, RFLP 方法难以应付。本发明构建的 DNA 芯片非常适合于 PKU 的诊断筛选。

说明书

丙型肝炎病毒 HCV 5'非编码区基因分型生物芯片

本发明涉及一种丙型肝炎病毒 HCV 5'非编码区基因分型生物芯片。

丙型肝炎病毒 HCV 是 9,600 个核苷酸的单链 RNA 病毒。含有一个编码 3011 氨基酸的 ORF 和 5'非编码区(5'-Non-coding region), 3'非编码区。

HCV 病毒现在发现有十大类型(HCV type1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); 每一大类型又有许多亚型(subtypes), 如 HCV1a, HCV2b 等。在临床上不同的亚型对于 α -IFN 的治疗, 肝病的发生过程及严重程度有重要意义。HCV 不同基因型也影响 HCV 感染的抗体诊断及病毒传染途径。 α -IFN 是治疗 HCV 感染最有效的方法之一, 有关研究发现, HCV 不同的亚型对 α -IFN 有不同的治疗效果, 如 HCV 1a, 1b, 2a, 3a 的治疗 LTR(long-term response)分别为 20%, 7%, 17% 和 16%。RIBAVIRIN 是治疗慢性 HCV 肝炎的药物, 经常与 α -IFN 同时使用, 相关研究结果是 HCV 1b, 2a, 3a 的 LTR 分别是 20%, 40%和 75%。另外, HCV 1b 和 4 比 HCV 1a, 2a, 3a 感染在手术移植后, 更快出现慢性肝病和 cirrhosis 并发症; 而 HCV 1b 感染也更容易导致严重的慢性肝炎, cirrhosis 和 HCC(hepatocellular carcinoma)形成。

人类在疾病基因诊断(又称分子诊断)上的早期实践始于 70 年代初期, 但直到 80 年代中期 PCR(polymerase chain reaction)技术诞生后, 其在医学诊断上的应用才得到了迅速的发展。现代基因诊断是应用分子生物学高新技术——如 PCR、分子杂交和 DNA 测序等技术手段, 通过在分子水平上对被检样品进行分析来达到诊断疾病的目的。

目前人类对人体基因及病原体基因致病性的知识积累, 已使基因诊断技术广泛应用于人类遗传病、传染病、肿瘤和其他与基因相关的许多疾病等方面的诊断。与医学上传统的实验诊断比较, 基因诊断技术的主要优势是能获得高度特异性的针对病因分子的诊断结果, 而对于人类遗传病, 细菌, 病毒感染和某些肿瘤病而言, 基因诊断结果是最后的确诊指标。简变快速可靠的现代基因诊断新技术的发展, 特别是最近生物芯片(biochip)技术的出现, 其发展趋势将不可避免的替代现有临床实验室的许多方法, 并可能改变传统的医学诊断观念。

现在 HCV 的亚型分析一般是分析 5'非编码区(5'NCR), 核心(core)区序列和 NS5B 序列。利用的方法主要有(1) PCR-RFLP(restriction fragment length

polymorphism), 该方法利用多种限制性内切酶对基因扩增产物进行酶切, 不同的基因序列将产生不同的电泳图谱(Davidson F et al, J Gen Virol 1995, 76, 1197-1204; Murphy D et al, J Infect Dis, 1994, 169, 473-475; Mellor J et al, J Gen Virol, 1995, 76, 2493-2507), 该方法只能应用于当突变改变了某一酶切位点时。(2) 探针杂交方法(Stuyver J et al, Virus Res, 1995, 38, 137-157; Tisminetzky SG et al, Int Hepatol Commun, 1994, 2, 105-142), 待测基因经 PCR 扩增后, 分别与 15-20bp 标记的特异性探针杂交。该方法需进行同位素标记或地高辛, 生物素, 过氧化物酶等标记, 分析过程复杂, 不适宜快速分析。(3) 特异性 PCR 引物扩增方法(Okamoto H et al, J Gen Virol, 1992, 73, 673-679; Okamoto H et al, J Gen Virol, 1993, 74, 2385-2390), 其原理是根据已知突变位点的性质在引物中设计一错配碱基, 使之仅能扩增突变型或野生型基因。该方法较为快速简便。但一次只能检测有限的亚型。(4) DNA 酶免疫分析方法(DNA enzyme immunoassay)(Viazov S et al, J Virol Methods, 1994, 48, 81-91)。(5) DNA 测序法, 这是最直观, 最准确的方法。但技术复杂价格昂贵, 不能作为常规方法。(6) ELISA 分析法(Simmonds P et al, J Clin Microbiol, 1993, 31, 1493-503; Bhattacharjee V et al, J Gen Virol, 1995, 76, 1737-48; Machida A et al, Hepatology, 1992, 16, 886-91; Tanaka T et al, Hepatology, 1994, 19, 1347-53), 这种方法只能对 HCV 病毒的主要类型(type), 如 HCV1 和 HCV2, 进行分类, 不能分析亚型(subtype)。

综上所述, 在有关丙型肝炎病毒 HCV 的诊断及基因分型的现有技术中, 存在操作繁杂, 所需时间长, 成本较高, 难以自动化及大量样本平行分析等问题。本发明的目的就是针对现有技术的不足, 提出一种与现有技术完全不同的有关 HCV 基因分型诊断方法。利用 DNA 芯片技术检测 HCV 病毒, 并对 30 多种亚型进行分型。

本发明的目的是提供一种可以方便, 快速地一次检测 30 种左右的丙型肝炎病毒的亚型的丙型肝炎病毒 HCV5'非编码区基因分型生物芯片。

为了达到上述目的本发明采取下列措施:

丙型肝炎病毒 HCV5'非编码区基因分型的生物芯片是在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定诊断丙型肝炎病毒及其 30 多种亚型的 DNA 探针, 所说的探针为:

HCV1(127-113)	ATG CCT GGA GAT TTG
HCV1(168-154)	TTG CCA GGA CGA CCG

HCV1a(242-228)	GTG TCG TGC AGC CTC
HCV1b(106-92)	CCC CCG CGA GAC T/CGC
HCV1c(145-131)	CTT GGA TTA ACC CGC
HCV1d(144-130)	TTG GAT AAC CCC GCT
HCV1f(143-129)	TGG ATC TAA CCG CTC
HCV2(139-125)	TAA ACC CAC TCT ATG
HCV2(83-69)	TAG CGT TGG GTT GCG
HCV2a(128-114)	TAT GCC CGG TCA TTT
HCV2b(168-154)	TTA CCG GAA AGA CTG
HCV2c(126-112)	TGC CCG GCC ATT TGG
HCV2d(129-115)	CTA TGC CTG GTC ATT
HCV2e(101-87)	GCA AGA CCG CTA GCC
HCV3(170-156)	AAT CGC TGG GGT GAC
HCV3(129-114)	CAA TAC CCA GAA ATT T
HCV3(103-89)	CCG CGA GAT CAC TAG
HCV3a(146-132)	TCT TGG AGC AAC CCG
HCV3d(145-132)	CTT GGA ACA AAC CCG
HCV3f(145-132)	CTT GGA ATC AAC CCG
HCV4(244-229)	GAG TGT TGT ACA GCC T
HCV4(170-156)	AAT CGC CGG GAT GAC
HCV4bg(127-113)	ATG CCC GGC AAT TTG
HCV4e(144-129)	TTG GAT TAA ACC GCT C
HCV5a(243-229)	AGT GTC GAA CAG CCT
HCV6ab(147-136)	TTC CAT TGG ATC AAA
HCV6a(242-228)	GTG TCG TAC AGC CTC
HCV10a(168-154)	TCG CCG GGT TGA CCG

本发明与现有技术相比，可以方便，快速地一次检测 30 种左右的丙型肝炎病毒的亚型，非常适合于临床的病毒基因分型。每一种病毒亚型有一种杂交信号模式，通过杂交信号模式分析，判断待检测病毒的亚型，分辨率高，专一性强。一次测试能检测的病毒亚型数是现有技术中最多的。采用荧光分析方法，灵敏度高。同一芯片可同时检测 HCV1a, HCV1b, HCV1c, HCV1d, HCV1e, HCV1f, HCV2a, HCV2b, HCV2c, HCV2d, HCV2e, HCV3a, HCV3b, HCV3c, HCV3d, HCV3e, HCV3f, HCV4a,

HCV4b, HCV4c, HCV4d, HCV4e HCV4f, HCV4g, HCV5a, HCV6a, HCV6b, HCV10a。本发明也适用于其他病毒和微生物的检测及基因分型, 如 HBV 的基因分型。

下面结合附图和实施例对本发明作详细说明。

图 1 是丙型肝炎病毒 (HCV) 5'非编码区基因分型生物芯片模式图;

图 2 是检测 HCV2a, 1b 病毒的杂交信号模式示意图;

图 3 是 HCV1b, HCV2a 检测杂交结果图。

本发明的目的是这样实现的。通过对 HCV 病毒的 5'非编码区 (5'NCR) 的 PCR 扩增及特异性探针杂交的方法鉴定 HCV 病毒的基因型 1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1e, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4k, 5a, 6a, 6b 和 10a。

5'非编码区 (5'NCR) 的核苷酸序列 (341 bp)

5' non-coding region of HCV-1 1a genome

(GenBank ACC No. D31603)

```
1 gccagccccc gatcgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg
61 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc
121 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gactacaccg gaattgccag
181 gacgaccggg tcctttcttg gatctaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc
241 gcgagaccgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg
301 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcat c
```

5'非编码区 (5'NCR) 的PCR扩增引物 (243 bp):

Primers of 5' non-coding region of HCV-1 1a genome

OLIGO	tm	gc%	seq
PrimerHCV1	59.37	50.00	cttcacgcagaaagcgtcta
PrimerHCV2	60.42	55.00	gcaccctatcaggcagtacc

探针设计: 搜查大量文献资料, 比较 HCV 的所有类型及亚型的 5'非编码区 (5'NCR) 的 340bp 的序列, 用计算机软件设计可分析 30 多种亚型的 DNA 探针, 设计的探针为

HCV1(127-113) ATG CCT GGA GAT

HCV1 (168-154)	TTG CCA GGA CGA CCG
HCV1a (242-228)	GTG TCG TGC AGC CTC
HCV1b (106-92)	CCC CCG CGA GAC T/CGC
HCV1c (145-131)	CTT GGA TTA ACC CGC
HCV1d (144-130)	TTG GAT AAC CCC GCT
HCV1f (143-129)	TGG ATC TAA CCG CTC
HCV2 (139-125)	TAA ACC CAC TCT ATG
HCV2 (83-69)	TAG CGT TGG GTT GCG
HCV2a (128-114)	TAT GCC CGG TCA TTT
HCV2b (168-154)	TTA CCG GAA AGA CTG
HCV2c (126-112)	TGC CCG GCC ATT TGG
HCV2d (129-115)	CTA TGC CTG GTC ATT
HCV2e (101-87)	GCA AGA CCG CTA GCC
HCV3 (170-156)	AAT CGC TGG GGT GAC
HCV3 (129-114)	CAA TAC CCA GAA ATT T
HCV3 (103-89)	CCG CGA GAT CAC TAG
HCV3a (146-132)	TCT TGG AGC AAC CCG
HCV3d (145-132)	CTT GGA ACA AAC CCG
HCV3f (145-132)	CTT GGA ATC AAC CCG
HCV4 (244-229)	GAG TGT TGT ACA GCC T
HCV4 (170-156)	AAT CGC CGG GAT GAC
HCV4bg (127-113)	ATG CCC GGC AAT TTG
HCV4e (144-129)	TTG GAT TAA ACC GCT C
HCV5a (243-229)	AGT GTC GAA CAG CCT
HCV6ab (147-136)	TTC CAT TGG ATC AAA
HCV6a (242-228)	GTG TCG TAC AGC CTC
HCV10a (168-154)	TCG CCG GGT TGA CCG

DNA 探针的固定:

氨基修饰 DNA 探针 ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6\text{-DNA oligo}$), 以上 28 种 DNA 探针以每种探针重复 2 次以上固定于载体表面(载玻片, 硅片, 高分子材料, 膜等)。

样品处理:

取待测者血液 1 毫升, 利用商业化的 RT-PCR (逆转录-聚合酶链式反应)

扩增 HCV 病毒 5'非编码区(5'NCR)，引物 5'末端用荧光修饰。PCR 产物加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的-20 °C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 °C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70%乙醇洗涤沉淀，干燥。

DNA 芯片表面杂交过程：

5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA，95 °C 变性 5 分钟，冷却至室温，滴加于 DNA 阵列表面，再盖上载玻片，42 °C 杂交 4~8 小时。

杂交信号检测及信号模式分析：

用共聚焦荧光显微镜或荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号。通过信号模式分析判别 HCV 病毒亚型。

信号模式识别分析表

HCV1a: 1, 2, 3
HCV1b: 1, 2, 4
HCV1c: 1, 2, 5, 3
HCV1d: 1, 2, 6
HCV1e: 1, 2, 27
HCV1f: 1, 2, 7
HCV2a: 8, 9, 10
HCV2b: 8, 9, 11
HCV2c: 8, 9, 12
HCV2d: 8, 9, 13
HCV2e: 8, 9, 14
HCV3a: 15, 16, 17, 18, 3
HCV3b: 17, 3, 22
HCV3c: 15, 16, 3
HCV3d: 15, 16, 17, 3, 19
HCV3e: 15, 16, 17, 3
HCV3f: 3, 20
HCV4a: 21
HCV4b: 21, 22, 23
HCV4c: 21, 22
HCV4d: 21, 22

HCV4e: 21, 22, 24

HCV4f: 21, 20

HCV4g: 19, 23

HCV4h: 20, 22

HCV4k: 22

HCV5a: 25

HCV6a: 1, 9, 26, 27

HCV6b: 1, 2, 3, 9, 26

HCV10a: 3, 28

图 1 为丙型肝炎病毒(HCV)5'非编码区(5' non-coding region, NCR)基因分型的生物芯片模式图。1: HCV1(127-113), 2: HCV1(168-154), 3: HCV1a(242-228), 4: HCV1b(106-29), 5: HCV1c(145-131), 6: HCV1d(144-130), 7: HCV1f(143-129), 8: HCV2(139-125), 9: HCV2(83-69), 10: HCV2a(128-114), 11: HCV2b(168-154), 12: HCV2c(126-112), 13: HCV2d(129-115), 14: HCV2e(101-87), 15: HCV3(170-156), 16: HCV3(129-114), 17: HCV3(103-89), 18: HCV3a(146-132), 19: HCV3d(145-132), 20: HCV3f(145-132), 21: HCV4(244-229), 22: HCV4(170-156), 23: HCV4bg(127-113), 24: HCV4e(144-129), 25: HCV5a(243-229), 26: HCV6ab(149-135), 27: HCV6a(242-228), 28: HCV10a(168-154)。

图 2 为检测 HCV2a, 1b 病毒的杂交信号模式。HCV2a 的信号点是 8, 9, 10; HCV1b 的信号点是 1, 2, 4。

图 3 HCV2a, HCV1b 检测杂交结果图

实施例 1

利用本发明的生物芯片检测 HCV 2a 病毒。取待测者血液 1 毫升, 用设计的 PCR (聚合酶链式反应) 引物 PrimerHCV1: cttcacgcagaaagcgtcta 和 PrimerHCV2: FITC- gcaccctatcaggcagtagc 和商业化的 RT-PCR (逆转录-聚合酶链式反应) 试剂盒扩增 HCV 病毒 5'非编码区(5'NCR)。得 243 bp 的基因片段, 加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液, 加入 2.5 倍体积的-20 °C 冷藏的 100%乙醇, 混匀后, -20 °C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥。5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA, 95 °C 变性 5 分钟, 冷却至室温, 滴加于 DNA 阵列表面, 再盖上载玻片, 42 °C 杂交 4~8 小时。用荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号, 结果如图 3 右图。

实施例 2

利用本发明的生物芯片检测 HCV 1b 病毒。取待测者血液 1 毫升，用设计的 PCR（聚合酶链式反应）引物 PrimerHCV1: cttcacgcagaaagcgtcta 和 PrimerHCV2: FITC- gcaccctatcaggcagtacc 和商业化的 RT-PCR（逆转录-聚合酶链式反应）试剂盒扩增 HCV 病毒 5'非编码区(5'NCR)。得 243 bp 的基因片断，加入 1/10 体积的 3M pH5.2 醋酸缓冲液，加入 2.5 倍体积的-20 °C 冷藏的 100%乙醇，混匀后，-20 °C 放置 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟，用 70%乙醇洗涤沉淀，干燥。5 μ l 杂交缓冲液(5 X SSC, 0.2% SDS)溶解上述 DNA，95 °C 变性 5 分钟，冷却至室温，滴加于 DNA 阵列表面，再盖上载玻片，42 °C 杂交 4~8 小时。用荧光扫描仪检测 DNA 芯片杂交信号，结果如图 3 左图。

权 利 要 求 书

1. 一种检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因突变的 DNA 芯片, 其特征在于利用微机械阵列点样仪将检测各种疾病相关基因突变的 DNA 探针固定于玻片、硅片、膜、高分子材料载体上, 所说的探针为:

- | | |
|---------|---------------------|
| 95(1) | GAT ACA CAC ATA TTC |
| 95(2) | GAT ACA CGC ATA TTC |
| 371(1) | AAC AGC CAC ATG GAT |
| 371(2) | AAC AGC CGC ATG GAT |
| 392(1) | CAC CTG GGG TCA CAG |
| 392(2) | CAC CTG GTG TCA CAG |
| 487(1) | CAG CAG AGG CTG GAA |
| 487(2) | CAG CAG AAG CTG GAA |
| 493(1) | AGG CTG GAA CCG CAT |
| 493(2) | AGG CTG GGA CCG CAT |
| 517(1) | GAA GCC CTT CGG GAG |
| 517(2) | GAA GCC CCT CGG GAG |
| 519(2) | GAA GCC CTT GGG GAG |
| 592(1) | GAT CTA CCG CAT CGA |
| 592(2) | GAT CTA CTG CAT CGA |
| 835(1) | CGC CTC CAC CAA CTC |
| 835(2) | CGC CTC CTC CAA CTC |
| 1024(1) | CGT CGT CCT CTA TGT |
| 1024(2) | CGT CGT CTT CTA TGT |
| 1311(1) | ACG CCT ACG AGC GCC |
| 1311(2) | ACG CCT ATG AGC GCC |
| 1360(1) | CTT CGT GCG CAG GTG |
| 1360(2) | CTT CGT GTG CAG GTG |
| 1376(1) | GAG CTC CGT GAG GC |
| 1376(2) | GAG CTC CTT GAG GC |
| 1388(1) | GCC TGG CGT ATT TTC |
| 1388(2) | GCC TGG CAT ATT TTC |

权利要求书

1. 一种丙型肝炎病毒 HCV5'非编码区基因分型的生物芯片, 其特征在于在玻片、硅片、膜、高分子材料上固定检测丙型肝炎病毒及其 30 多种亚型的 DNA 探针, 所说的探针为:

HCV1(127-113)	ATG CCT GGA GAT TTG
HCV1(168-154)	TTG CCA GGA CGA CCG
HCV1a(242-228)	GTG TCG TGC AGC CTC
HCV1b(106-92)	CCC CCG CGA GAC T/CGC
HCV1c(145-131)	CTT GGA TTA ACC CGC
HCV1d(144-130)	TTG GAT AAC CCC GCT
HCV1f(143-129)	TGG ATC TAA CCG CTC
HCV2(139-125)	TAA ACC CAC TCT ATG
HCV2(83-69)	TAG CGT TGG GTT GCG
HCV2a(128-114)	TAT GCC CGG TCA TTT
HCV2b(168-154)	TTA CCG GAA AGA CTG
HCV2c(126-112)	TGC CCG GCC ATT TGG
HCV2d(129-115)	CTA TGC CTG GTC ATT
HCV2e(101-87)	GCA AGA CCG CTA GCC
HCV3(170-156)	AAT CGC TGG GGT GAC
HCV3(129-114)	CAA TAC CCA GAA ATT T
HCV3(103-89)	CCG CGA GAT CAC TAG
HCV3a(146-132)	TCT TGG AGC AAC CCG
HCV3d(145-132)	CTT GGA ACA AAC CCG
HCV3f(145-132)	CTT GGA ATC AAC CCG
HCV4(244-229)	GAG TGT TGT ACA GCC T
HCV4(170-156)	AAT CGC CGG GAT GAC
HCV4bg(127-113)	ATG CCC GGC AAT TTG
HCV4e(144-129)	TTG GAT TAA ACC GCT C
HCV5a(243-229)	AGT GTC GAA CAG CCT
HCV6ab(147-136)	TTC CAT TGG ATC AAA
HCV6a(242-228)	GTG TCG TAC AGC CTC
HCV10a(168-154)	TCG CCG GGT TGA CCG